Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Rafael Mesquita do Nascimento

Estudo de modelagem molecular das waltherionas ciclizadas isoladas de *Waltheria indica* (Malvaceae) como potenciais inibidores da principal protease do SARS-CoV-2 (novo coronavírus)

Rio de Janeiro

2023

RAFAEL MESQUITA DO NASCIMENTO

Estudo de modelagem molecular das waltherionas ciclizadas isoladas de *Waltheria indica* (Malvaceae) como potenciais inibidores da principal protease do SARS-CoV-2 (novo coronavírus)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Murilo Marinho Carvalho Lima

Rio de Janeiro-RJ

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Elaborada por Bibliotecária

CIP - Catalogação na Publicação
Bibliotecária: Alane Elias Souza – CRB7 6321

N244e Nascimento, Rafael Mesquita do
Estudo de modelagem molecular das waltherionas ciclizadas isoladas de Waltheria indica (Malvaceae) como potenciais inibidoresda principal protease do SARS-CoV-2 (novo coronavírus) / Rafael Mesquita do Nascimento - Rio de Janeiro , 2023.
90 f.

Orientação: Murilo Marinho Carvalho Lima.
Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado emFarmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia doRio de Janeiro, Campus Realengo, 2023.

1. Waltherionas. 2. Docking Molecular . 3. Previsão ADMET. 4. SARS-CoV-2. I. Lima, Murilo Marinho Carvalho, **orient**. II. InstitutoFederal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. III. Título

RAFAEL MESQUITA DO NASCIMENTO

Estudo de modelagem molecular das waltherionas ciclizadas isoladas de *Waltheria indica* (Malvaceae) como potenciais inibidores da principal protease do SARS-CoV-2 (novo coronavírus)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 27/06/2023.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Murilo Marinho Carvalho Lima
Orientador - Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Profª. Drª. Anne Caroline Cândido Gomes
Membro Interno - Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Prof. Dr. Paulo Galdino de Lima
Membro Interno - Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobretudo a minha mãe e ao meu padrasto, que sempre me apoiaram desde o início da faculdade, me proporcionando o suporte necessário para que eu pudesse estudar e me dedicar exclusivamente ao curso, sem que tivesse que me preocupar em complementar a renda da casa. Além disso, eles me deram apoio emocional em todos os momentos difíceis em que não eu me sentia confiante o bastante na minha capacidade de prosseguir com o curso em função dos obstáculos que surgiram ao longo da minha jornada acadêmica.

Aos amigos que fiz durante o tempo que passei no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) *Campus* Realengo, particularmente ao Leonardo, Douglas e Késia, que sempre estiveram dispostos a me ouvir quando eu estava passando por um momento complicado na minha vida. Sem dúvida, o suporte emocional proporcionado por eles foi vital para o meu desenvolvimento pessoal durante este período da minha vida.

Aos professores do campus, que em sua grande maioria foram sempre muito solícitos e empenhados em auxiliar os discentes, constantemente buscando aperfeiçoar a sua didática e atender as necessidades dos alunos que apresentavam dificuldades nas disciplinas. Este é um ponto que preciso ressaltar, pois em nenhum momento me senti intimidado, desmotivado ou desencorajado durante alguma aula, o que certamente contribuiu para que eu ganhasse mais confiança no meu potencial para aprender e aplicar os meus conhecimentos, mesmo diante das inseguranças que temos em algumas disciplinas, sobretudo nas práticas.

Ao meu orientador por ter me escolhido para conduzir este trabalho e pelo auxílio durante a realização do projeto.

Ao professor Rodolfo Goetze Fiorot pela sua contribuição na realização do trabalho, sobretudo por ter me apresentado às ferramentas e técnicas que foram empregadas durante a condução do projeto e pelas correções de metodologia.

Ao CNPq pela bolsa concedida para realização do projeto. O auxílio financeiro foi essencial para que eu pudesse continuar trabalhando no projeto durante a pandemia.

DO NASCIMENTO, Rafael Mesquita. Estudo de modelagem molecular das waltherionas ciclizadas isoladas de *Waltheria indica* (*Malvaceae*) como potenciais inibidores da principal protease do SARS-CoV-2 (novo coronavírus). Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro (RJ), 2023.

RESUMO

O recente surto global de uma síndrome respiratória aguda agrave (SARS, do inglês "*Severe Acute Respiratory Syndrome*"), uma infecção respiratória viral causada por um coronavírus emergente, o SARS-CoV-2, motivou a comunidade científica a investigar o potencial terapêutico de fármacos já disponíveis comercialmente e de compostos de origem natural, originalmente empregados para outras finalidades, frente à infecção por este vírus - estratégia conhecida como "reposicionamento de fármacos". Os compostos de origem natural mostraram-se candidatos particularmente interessantes em virtude de sua abundância na natureza, possibilidade de extração e isolamento, vasto potencial terapêutico descrito na literatura e, em muitos casos, perfis satisfatórios de tolerabilidade e segurança. Diante destas circunstâncias, o presente estudo foi motivado pelos relatos prévios na literatura da atividade anti-HIV das waltherionas, assim como pelos artigos que sugeriam a possibilidade de inibição do SARS-CoV-2 por agentes anti-HIV. Além disso, as waltherionas A e C foram isoladas no laboratório de Bases Químicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) *Campus* Realengo. Portanto, o presente trabalho teve por finalidade averiguar o potencial farmacodinâmico das waltherionas de cadeia fechada A, B, C e D frente a principal protease do SARS-CoV-2, a M^{pro}, por meio de estudo de *docking* molecular. Adicionalmente, investigou-se o potencial farmacocinético destas moléculas via previsões das propriedades ADMET (características de absorção, distribuição, metabolização, eliminação e propriedades toxicológicas) em três plataformas de livre acesso frequentemente utilizadas na literatura – SwissADME, PreADMET e pkCSM. Os resultados sugerem que as waltherionas A, B e C podem ser bons candidatos a fármaco em função de suas propriedades farmacocinéticas e perfil de estrutura-atividade frente a M^{pro}.

Palavras-Chave: waltherionas. SARS-CoV-2. *docking* molecular. inibidores da M^{pro}. estudo *in sílico*. previsão ADMET. *druglikeness*.

DO NASCIMENTO, Rafael Mesquita. Molecular modeling study of the cyclic alkaloids isolated from *Waltheria indica* (*Malvaceae*) as potentional inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro (RJ), 2023.

ABSTRACT

The recent outbreak of a new type of severe acute respiratory syndrome (SARS), a viral respiratory disease caused by an emergent coronavirus, SARS-CoV-2, motivated the scientific community to investigate the therapeutic potential of commercially available drugs and naturally occurring compounds, originally intended for other purposes, against this virus - a strategy known as "drug repurposing" or "drug repositioning". The natural products were of particular interest because of their abundance in nature, possibility of extraction and isolation, vast therapeutic potential described in the scientific literature, and, in many cases, satisfactory tolerability and safety profiles. This study was motivated by previous articles in the literature that described the anti-HIV activity of the waltheriones as well as homology studies that suggested that anti-HIV agents might be capable of inhibiting SARS-CoV-2. Moreover, the waltheriones A and C were isolated in the Chemistry Laboratory of the Federal Institute of Science, Education, and Technology of Rio de Janeiro (IFRJ) Campus Realengo. Therefore, this study aimed to investigate the pharmacodynamic potential of the closed chain waltheriones A, B, C, and D against the main protease of SARS-CoV-2, M^{pro}, through molecular docking. Additionally, the pharmacokinetic properties were estimated through ADMET (which stands for absorption, distribution, metabolism, elimination, and toxicity) predictions in free online tools typically used for this purpose in the literature - SwissADME, PreADMET e pkCSM. The results suggest that waltheriones A, B, and C might be promising drug candidates in terms of their pharmacokinect properties and structure-activity relationship profile against M^{pro}.

Key-words: waltheriones. SARS-CoV-2. molecular docking. M^{pro} inhibitors. in silico studies. ADMET predictions. druglikeness.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicologia
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
BHE	Barreira Hematoencefálica
$C_{cérebro}/C_{plasma}$	Coeficiente de partição cérebro/plasma
COVID-19	*Coronavirus Disease* 2019/Doença do Coronavírus de 2019
CYP	Citocromo
Cys	Cisteína
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico/Glutamato
Gly	Glicina
HIA	*Human Intestinal Absorption*/Absorção Intestinal Humana
His	Histidina
HIV	*Human Immunodeficiency Virus*/ Vírus da Imunodeficiência Humana
Kb	kilobases
LD50	*Lethal Dose* 50%/Dose letal 50%
Leu	Leucina

LOAEL	*Lowest Observed Adverse Effect Level*/Menor Dose Observada para Causar Efeitos Adversos
Log P	Logaritmo da Partição Octanol-Água
LogS	Logaritmo na base 10 da concentração em água em mol L-1
mAb	*Monoclonal Antibodies*/Anticorpos Monoclonais
Met	Metionina
MM	*Molar Mass*/Massa Molar
$3CL^{pro}/M^{pro}$	*3-Chymotrypsin-Like Protease*/Protease Semelhante à 3-Quimotripsina
OMS	Organização Mundial da Saúde
P-gp	Glicoproteína P
PBD	*Protein Data Bank*/Banco de Dados de Proteínas
PBHE	Permeabilidade pela Barreira Hematoencefálica
P_{Caco-2}	Permeabilidade das Células Caco-2
$P_{cutânea}$	Permeabilidade pela Pele
Phe	Fenilalanina
pp1a	*Polyprotein 1a*/Poliproteína 1a
pp1b	*Polyprotein 1b*/Poliproteína 1b
PPB	*Plasma Protein Binding*/Ligação a Proteínas Plasmáticas
Pro	Prolina
PSA	*Polar Surface Area*/Área de Superfície Polar
RdRp	*RNA-Dependent RNA Polymerase*/RNA Polimerase RNA-Dependente
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

RMSD	*Root Mean Square Deviation*/ Raiz Quadrada do Erro-Médio
RNA	*Ribonucleic Acid*/Ácido Ribonucleico
SAR	*Structure-Activity Relationship*/Relação Estrutura-Atividade
SARS-CoV-1	*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1*/Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 1
SARS-CoV-2	*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*/Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
Ser	Serina
SKlogP	Valor de log P Calculado pelo SK *Atomic Types*
TGI	Trato Gastrointestinal
Thr	Treonina
TPSA	*Topological Polar Surface Area*/Área de Superfície Polar Topológica
Tyr	Tirosina
VD	Volume de Distribuição
VOC	*Variants of Concern*/Variantes de Preocupação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **16**

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO **16**

1.2 DOCKING MOLECULAR – FUNDAMENTOS E APLICABILIDADE **18**

1.3 QUÍMICA DOS ALCALOIDES ANTI-HIV ISOLADOS DA *WALTHERIA INDICA* (*MALVACEAE*) – WALTHERIONAS A, B, C E D **20**

1.4 OBJETIVO **24**

1.4.1 OBJETIVO GERAL **24**

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS **24**

1.5 METODOLOGIA **25**

1.5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO **25**

1.5.2 PREVISÃO ADMET E PERFIL DRUG-LIKENESS **25**

1.5.3 PREPARAÇÃO DOS LIGANTES – MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO **26**

1.5.4 PREPARAÇÃO DA $3CL^{PRO}$/M^{PRO} E FORMAÇÃO DO COMPLEXO LIGANTE-RECEPTOR **27**

1.5.5 REDOCKING (VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA) E DOCKING **28**

2 DESENVOLVIMENTO **30**

2.1 PREVISÃO ADMET (PARÂMETROS DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLIZAÇÃO, ELIMINAÇÃO E TOXICOLÓGICOS) **30**

2.1.1 SIMULAÇÕES *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS COM A FERRAMENTA SWISSADME **30**

2.1.2 SIMULAÇÕES *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS COM A FERRAMENTA PREADME **37**

2.1.3 SIMULAÇÕES *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS COM A FERRAMENTA PKCSM **40**

2.1.4 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS TRÊS PLATAFORMAS **43**

2.2 REDOCKING **44**

2.2.1 VALIDAÇÃO DA METADOLOGIA DE DOCKING COM A ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7K0E COMPLEXADA COM O LIGANTE K36 **.....44**

2.2.2 VALIDAÇÃO DA METADOLOGIA DE DOCKING COM A ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7TLL COMPLEXADA COM O LIGANTE NIRMATRELVIR**.....46**

2.3 DOCKING **.....48**

2.3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O SÍTIO ATIVO DA M^{PRO} **.....48**

2.3.2 DOCKING DO COMPLEXO GERADO A PARTIR DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7K0E COM O AUTODOCK 4.2.6 – 100 CORRIDAS INDEPENDENTES **.....53**

2.3.2 DOCKING DO COMPLEXO GERADO A PARTIR DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7TLL COM O AUTODOCK 4.2.6 – 100 CORRIDAS INDEPENDENTES **.....67**

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS 81

4 REFERÊNCIAS.....83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estruturas químicas das waltherionas de cadeia fechada A, B e C.....**21**
FIGURA 2 - Estrutura química da waltheriona D.....**21**
FIGURA 3 - *Waltheria indica* em seu habitat.....**22**
FIGURA 4 - Resultado da superposição do ligante cristalográfico K36 antes e após o redocking (código: PDB:7k0e).....**45**
FIGURA 5 - Informações sobre a conformação de menor energia do cluster gerado por docking, mostrando o valor obtido para o RMSD (código: PDB:7k0e).....**46**
FIGURA 6 - Resultado da superposição do ligante cristalográfico nirmatrelvir antes e após o redocking (código: PDB:7tll).....**47**
FIGURA 7 - Informações sobre a conformação de menor energia do cluster gerado por docking, mostrando o valor obtido para o RMSD (código: PDB:7tll).....**48**
FIGURA 8 - Ligação do inibidor N3 no sítio ativo da M^{pro}.....**49**
FIGURA 9 – Estrutura molecular do ligante N3.....**50**
FIGURA 10 – Mecanismo químico de inibição irreversível da Mpro pelo ligante N3...**50**
FIGURA 11 - Diagrama 2D mostrando o perfil de interações ligante-receptor do inibidor GC376 no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**53**
FIGURA 12 - Superfície de ligação de hidrogênio do ligante GC376 no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**54**
FIGURA 13 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**55**
FIGURA 14 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**55**
FIGURA 15 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona A com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**56**
FIGURA 16 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**57**
FIGURA 17 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**57**

FIGURA 18 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona B com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**58**
FIGURA 19 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**59**
FIGURA 20 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**59**
FIGURA 21 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona C com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**60**
FIGURA 22 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**61**
FIGURA 23 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**61**
FIGURA 24 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona D com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7k0e).....**62**
FIGURA 25 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor do nirmatrelvir no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**67**
FIGURA 26 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor do nirmatrelvir no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**68**
FIGURA 27 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação do nirmatrelvir com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**68**
FIGURA 28 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**69**
FIGURA 29 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**69**
FIGURA 30 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona A com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**70**
FIGURA 31 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**71**

FIGURA 32 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**71**
FIGURA 33 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona B com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**72**
FIGURA 34 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**73**
FIGURA 35 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**73**
FIGURA 36 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona C com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**74**
FIGURA 37 - Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**75**
FIGURA 38 - Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**75**
FIGURA 39 - Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona D com o sítio ativo da Mpro (código: PDB:7tll).....**76**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros relacionados à absorção das waltherionas (SwissADME).....**31**
TABELA 2 - Parâmetros relacionados ao metabolismo/biotransformação e à distribuição das waltherionas (SwissADME).....**32**
TABELA 3 - Parâmetros relacionados à absorção das waltherionas (PreADME).....**38**
TABELA 4 - Parâmetros relacionados à distribuição das waltherionas (PreADME)....**38**
TABELA 5 - Parâmetros relacionados à metabolização/biotransformação das waltherionas (PreADME).....**39**
TABELA 6 - Parâmetros relacionados à toxicidade das waltherionas (PreADME).....**40**
TABELA 7 - Parâmetros relacionados à absorção das waltherionas (pkCSM).....**41**
TABELA 8 - Parâmetros relacionados à distribuição das waltherionas (pkCSM).....**41**

TABELA 9 - Parâmetros relacionados à metabolização/biotransformação das waltherionas (pkCSM).....**42**
TABELA 10 - Parâmetros relacionados à toxicidade das waltherionas (pkCSM).....**43**
TABELA 11 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição das waltherionas ciclizadas com a Mpro (código PDB:7k0e).....**64**
TABELA 12 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição dos controles com a Mpro (código PDB:7k0e).....**65**
TABELA 13 – Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição das waltherionas ciclizadas com a Mpro (código PDB:7tll)...**78**
TABELA 14 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição dos controles com a Mpro (código PDB:7tll).....**79**

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Gráfico *boiled-egg* da waltheriona A gerado pelo SwissADME.....**33**
GRÁFICO 2 - Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona A gerado pelo SwissADME.....**33**
GRÁFICO 3 – Gráfico *boiled-egg* da waltheriona B gerado pelo SwissADME.....**34**
GRÁFICO 4 – Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona B gerado pelo SwissADME.....**34**
GRÁFICO 5 – Gráfico *boiled-egg* da waltheriona C gerado pelo SwissADME.....**35**
GRÁFICO 6 – Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona C gerado pelo SwissADME.....**35**
GRÁFICO 7 – Gráfico *boiled-egg* da waltheriona D gerado pelo SwissADME.....**36**
GRÁFICO 8 - Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona D gerado pelo SwissADME.....**37**

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O recente surto de uma nova síndrome respiratória aguda grave, causada por um coronavírus emergente, o SARS-CoV-2, e nomeada COVID-19, surgiu como uma ameaça à saúde pública de abrangência global. O status de pandemia foi oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020. Diante da crise estabelecida, a comunidade científica vem empregando intensos esforços desde então no sentido de buscar alternativas que permitissem a prevenção (vacinas) e o tratamento (reposicionamento de fármacos) da COVID-19, sobretudo com foco na minimização do agravamento do quadro clínico (OLIVEIRA et al., 2020).

Desde então, várias vacinas foram desenvolvidas e aplicadas na população como forma de enfrentar a pandemia, minimizando a ocorrência de casos graves da doença. Atualmente, até 14 de junho de 2023, foram registrados 767,984,989 casos confirmados de COVID-19 e 6,943,390 mortes. Até 13 de junho de 2023, um total de 13,397,334,282 doses de vacinas foram administradas globalmente (“WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data”, 2023). No Brasil, até 30 de junho de 2023, foram contabilizados 37,671,420 casos confirmados e 703,964 óbitos (“Coronavírus Brasil”, 2023).

O SARS-CoV-2 foi identificado como o sétimo membro clinicamente relevante da família coronaviridae e, por meio de uma análise de alinhamento da sequência do genoma viral, é o que apresenta o maior grau de homologia de sequência genômica em relação ao SARS-CoV-1 (dando origem ao seu nome), vírus que causou um surto de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS, do inglês “*Severe Acute Respiratory Syndrome*”) em 2003 em Hong Kong (PENG SANG et al., 2020). Os membros dessa família são betacoronavirus envelopados com RNA de fita simples de polaridade positiva que apresentam cerca de 26-32kb (kilobases) de genoma (MENGIST; DILNESSA; JIN, 2021).

Foi identificado que o genoma do SARS-CoV-2 codifica quatro proteínas estruturais principais: glicoproteína *spike* de pico (S), proteína de envelope (E), proteína de membrana (M) e proteína nucleocapsídica (N). Ademais, além dessas proteínas estruturais, o genoma do coronavírus codifica diversas proteínas não estruturais e acessórias essenciais para a replicação do vírus, sendo a protease

semelhante à 3-quimotripsina (3CL^{pro} ou M^{pro}) uma das mais importantes (YADAV et al., 2021). Esta cisteína-protease é necessária para a maturação e manutenção do ciclo de vida viral ao clivar as poliproteínas pp1a e pp1b em múltiplos sítios e, consequentemente, resultar na formação de 16 proteínas não estruturais intermediárias necessárias para a replicação e maturação do vírus, contribuindo para a sua virulência e patogenicidade (MENGIST; DILNESSA; JIN, 2021).

Adicionalmente, evidências recentes sugerem que as variantes de preocupação (VOC, do inglês "*Variants of Concern*") do SARS-CoV-2, isto é, as variantes *alfa, beta, gama, delta* e *ômicron*, não resultaram em mudanças significativas na potência antiviral de fármacos que possuem como alvo a RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* ou RdRp) e a protease principal semelhante à 3-quimotripsina (M^{pro} ou 3CL^{pro}). Especula-se que isto ocorra devido ao alto grau de conservação dessas proteínas, que são pouco afetadas após mutações. Em contrapartida, os anticorpos monoclonais (mAbs) que possuem como alvo molecular a glicoproteína *spike*, os quais apresentam um alto grau de variação mediante mutações no material genético, perderam a sua atividade frente à variante ômicron em estudos com cultura celular (VANGEEL et al., 2022).

Em função da gravidade do cenário de emergência sanitária decretado pela OMS no início de 2020 em função dos desdobramentos da pandemia de COVID-19, e levando em consideração os relatórios prévios de que inibidores da protease do HIV possuem atividade frente aos coronavírus, uma vez que a protease do tipo 3-quimotripsina (3CL^{pro} ou M^{pro}) é um alvo molecular particularmente interessante para nortear a busca por compostos anti-HIV, esses compostos passaram a ser também investigados como potenciais candidatos a fármaco para o tratamento de COVID-19 empregando estratégias computacionais, tal como o *docking* molecular (PENG SANG et al., 2020).

Até 25 de maio de 2023, os fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de COVID-19 são: tocilizumabe e baricitinibe - agentes imunomoduladores até então administrados para o tratamento da artrite reumatoide e artrite idiopática juvenil sistêmica, entre outras doenças autoimunes; remdesivir - análogo de nucleosídeo que inibe a ação da RNA polimerase; e a associação do nirmatrelvir, inibidor da 3CL^{pro}/M^{pro}, com o ritonavir, um agente medicinal anti-HIV inibidor de protease. ("Coronavirus (COVID-19) | Drugs | FDA", 2023)

No que tange a substâncias de origem natural, um estudo *in sílico* recente (ISMAIL et al., 2021) fez uma triagem virtual de alcaloides quinolônicos e quinazolinas, tendo selecionado 71 alcaloides bioativos, incluindo a waltheriona A, contra três alvos do SARS-CoV-2: a M^{pro}, proteína de pico *spike* e a ECA (Enzima Conversora de Angiotensina). Vários alcaloides com propriedades farmacocinéticas aceitáveis por previsão ADMET foram então submetidos a procedimento de *docking*, tendo a maioria apresentado perfis de interação favoráveis (ISMAIL et al., 2021).

1.2 DOCKING MOLECULAR – FUNDAMENTOS E APLICABILIDADE

A técnica de *docking* molecular é uma ferramenta de modelagem molecular frequentemente empregada no *design* de fármacos com base na estrutura química – estudos da relação estrutura-atividade (SAR, do inglês *Structure-Activity Relationship*) – já que permite a elucidação das interações do ligante com o seu sítio receptor no alvo molecular e fornece parâmetros para estimar a afinidade ligante-receptor, incluindo a energia livre de interação e o valor da constante de inibição (FAN; FU; ZHANG, 2019).

O *docking* molecular leva em consideração o modelo do encaixe induzido, isto é, aquele segundo o qual tanto a micromolécula (ligante) quanto a macromolécula (receptor) modificam as suas estruturas conformacionais ao interagirem uma com a outra, de modo a atingir uma disposição final que minimize a energia potencial do sistema (FAN; FU; ZHANG, 2019). As energias envolvidas incluem as forças coulombianas ou eletrostáticas (dipolo-dipolo, carga-dipolo e carga-carga), eletrodinâmicas (interações de van der Waals), estéricas (repulsão entre os grupamentos volumosos) e as forças relacionadas ao solvente (ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas), cuja soma culmina na energia potencial resultante do sistema. As contribuições de cada uma dessas forças são aproximadas por um *score* de *docking*, que depende do algoritmo de *docking* utilizado e representa o potencial de ligação da micromolécula/ligante (CHAUDHARY; MISHRA, 2016).

As estruturas das proteínas ou enzimas alvo empregadas nesses estudos são obtidas pelas técnicas de cristalografia de raios X, espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) e microscopia crio-eletrônica. No caso de proteínas de estrutura desconhecida, pode ser realizado o *docking* utilizando alvos modelados por homologia estrutural (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

A metodologia mais frequentemente empregada para esta finalidade é a cristalografia de raios X, que permite a determinação do arranjo espacial dos átomos de uma molécula pela análise do padrão de difração de raios X incididos em uma amostra de sólido cristalino do composto. No entanto, os átomos de hidrogênio são muito leves para difratar os raios X, de modo que a sua posição deve ser inferida a partir do restante da composição atômica da estrutura. É uma técnica particularmente interessante para a elucidação das estruturas de moléculas não identificadas, porém possui como limitações o fato de não poder ser utilizada para compostos líquidos e para sólidos que não formam bons cristais, além de levar um tempo considerável para se conduzir uma única análise - se comparada a outras metodologias mais modernas, como o RMN (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

A estrutura cristalográfica gerada computacionalmente leva em consideração as evidências experimentais e as informações fornecidas por modelagem molecular, as quais possibilitam a determinação da sequência de aminoácidos e a geometria dos grupamentos, isto é, os ângulos e comprimentos de ligação envolvidos (“PDB-101: Learn: Guide to Understanding PDB Data: Methods for Determining Structure”, 2023).

O Protein Data Bank (PDB), um banco de dados de estruturas cristalográficas de proteínas e enzimas, é uma das plataformas de livre acesso mais empregadas para a obtenção de estruturas de potenciais alvos terapêuticos para estudos de relação estrutura-atividade. A maior parte das estruturas cristalográficas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) foram obtidas por cristalografia de raios X, o que ressalta a relevância desta técnica experimental. Outras plataformas de livre acesso frequentemente utilizadas na literatura são o *PubChem Compound Database* e o *ZINC* (FAN; FU; ZHANG, 2019).

Nos casos em que não há uma estrutura cristalográfica já complexada com o ligante, as informações relativas ao sítio de ligação podem ser acessadas por programas que detectam cavidades que podem constituir potenciais sítios de interação (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017), tais como: GRID (GOODFORD, 1985), POCKET (LEVITT; BANASZAK, 1992), SURFNET (LASKOWSKI, 1995), PASS (*Putative Active Sites with Spheres*) (BRADY; STOUTEN, 2000) e MMC (*mapping macromolecular topography*) (MEZEI, 2003).

O *docking* apresenta aplicabilidade em diversos contextos, como, por exemplo, na triagem virtual de grupos de moléculas selecionadas a partir de pesquisas em bancos de dados de bioinformática com a finalidade de encontrar as substâncias mais

promissoras do ponto de vista das funções de *scoring* e das poses moleculares (FAN; FU; ZHANG, 2019). Ademais, a metodologia conhecida como *docking* reverso permite a identificação de novos alvos macromoleculares mediante o *docking* de fármacos nas cavidades de um grupo de alvos clinicamente relevantes (KHARKAR; WARRIER; GAUD, 2014). Além disso, podem ser feitas modificações estruturais em fármacos já existentes, o que auxilia na identificação de grupamentos farmacofóricos e, portanto, no *design* de novos candidatos a fármacos que apresentam alguma característica vantajosa em relação ao acervo terapêutico disponível para o tratamento de uma determinada condição clínica (FAN; FU; ZHANG, 2019).

1.3 QUÍMICA DOS ALCALOIDES ANTI-HIV ISOLADOS DA *Waltheria indica* (MALVACEAE) – WALTHERIONAS A, B, C E D

A *Waltheria indica* pertence à tribo Hermannieae da família Malvaceae. Esta é uma fonte rica de alcaloides ciclopeptídicos e quinolônicos (CRETTON et al., 2016). Os alcaloides quinolônicos denominados “waltherionas” possuem uma grande variedade de atividades biológicas, tais como atividade tripanocida (CRETTON et al., 2014), anti-helmíntica, antifúngica (CRETTON et al., 2015), leshmanicida (SILVA et al., 2022), inibidora da acetilcolinesterase (LIMA et al., 2008) e anti-HIV (VERMA; LALL, 2022), e até o momento são encontradas exclusivamente nos gêneros *Waltheria* e *Melochia*.

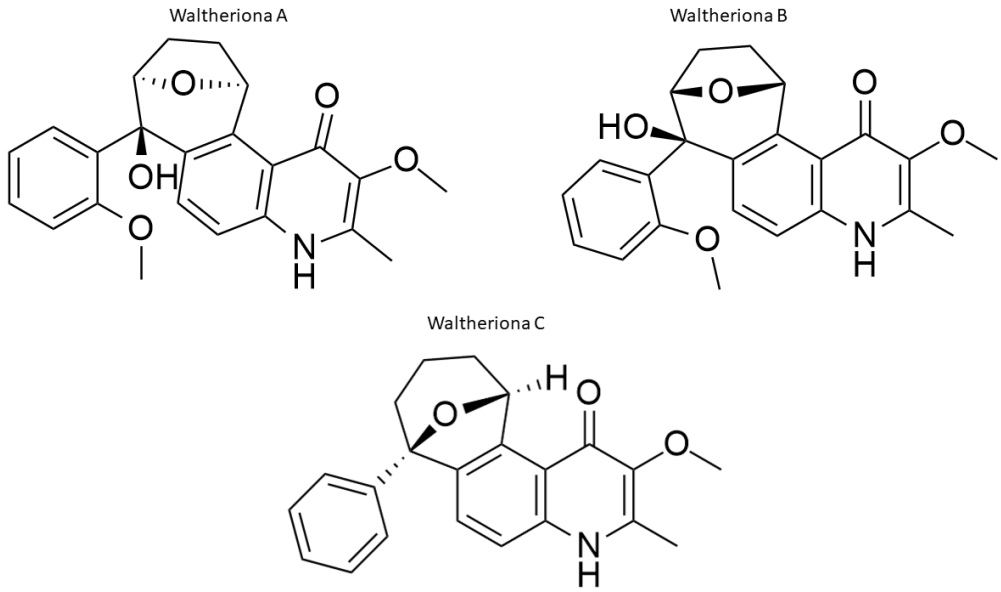
As waltherionas podem ser classificadas em dois grupos, as de cadeia aberta e as de cadeia fechada. As waltherionas são biossintetizadas através de uma cadeia policetídica C-16 com o aminoácido glicina (GERHARD BRINGMANN et al., 2000). Esta rota de biossíntese é inédita em plantas e microrganismos, de maneira que as waltherionas possuem uma distribuição restrita na natureza, constituindo uma nova classe de alcaloides 4-quinolônicos (DEWICK, 2009).

Acredita-se que o processo de biossíntese das waltherionas de cadeia fechada seja análogo aquele observado para as waltherionas de cadeia aberta, já que o núcleo 4-quinolona é idêntico, inclusive em termos da substituição metila na posição 2 e metoxila na posição 3, evidenciando o aminoácido glicina e a cadeia policetídica. A cadeia policetídica, por sua vez, é evidenciada pela construção do núcleo 4-quinolona e padrão de oxigenação da rota biossintética do acetato (DEWICK, 2009).

Dentre as waltherionas de cadeia fechada (A, B, C e D), duas delas, waltherionas A e C, foram isoladas pelo grupo de pesquisa do Professor Doutor Murilo

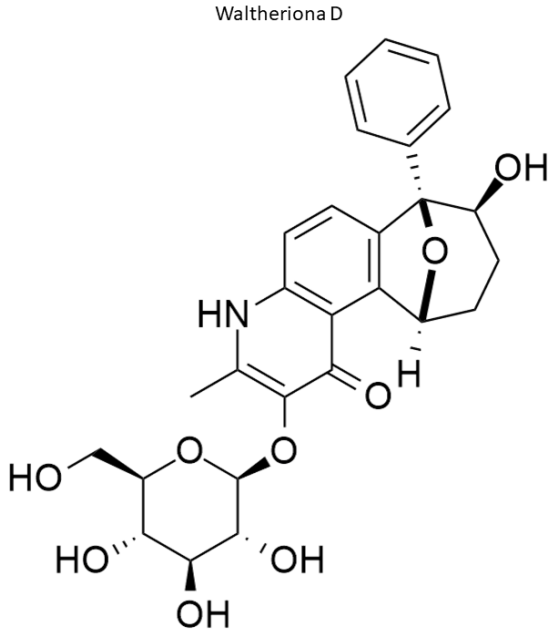
Marinho Carvalho Lima, no laboratório de Bases Químicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro *Campus* Realengo. O grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo de plantas dos gêneros *Waltheria* e *Melochia* desde 2013.

Figura 1: Estruturas químicas das waltherionas de cadeia fechada A, B e C.



Fonte: Desenho feito pelo autor a partir das estruturas fornecidas por Silva e colaboradores (2022).

Figura 2: Estrutura química da waltheriona D.



Fonte: Desenho adaptado a partir da estrutura fornecida por Silva e colaboradores (2022).

O gênero *Waltheria L*., pertencente à família Malvaceae, ordem Malvales, inclui 60 espécies ao todo. A espécie *Waltheria indica*, também conhecida pelo nome *Waltheria americana,* consiste em uma erva ou arbusto, sendo considerada como planta invasora ou erva daninha. Esta espécie tem vida curta, apresenta um pequeno porte, atingindo até 2m de altura e 2cm de diâmetro de caule, e é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, podendo ser encontrada nas Américas, Oeste, Leste e Sul da África e Sudeste da Ásia. No Havaí, a *Waltheria indica* é considerada uma das 10 plantas medicinais mais reconhecidas (ZONGO et al., 2013).

Figura 3: *Waltheria indica* em seu habitat



Fonte: Zongo e colaboradores (2013).

As raízes, folhas e até mesmo a planta inteira já foram amplamente utilizadas na medicina tradicional de diversas culturas. Na Nigéria, há relatos na literatura de que ela foi utilizada para o tratamento de diversas condições inflamatórias, tais como ferimentos, úlceras na pele, reumatismo, dor de garganta, gengivite, diarreia e conjuntivite. Infusões das raízes e das folhas foram utilizadas para o tratamento da gengivite, diarreia, anemia e infertilidade em Madagascar. Ademais, outras propriedades terapêuticas potenciais foram relatadas, como por exemplo para o tratamento da malária, convulsão, asma, hemorroida, hanseníase e disfunção erétil.

Também foram descritas atividades antimicrobiana e antiviral em alguns estudos (LACZKO et al., 2020; ZHANG et al., 2019; ZONGO et al., 2013).

Os compostos isolados e identificados da *Waltheria indica*, de acordo com os relatos encontrados na literatura, incluem: antidesmona; waltherionas de cadeia aberta E-Q; waltherionas de cadeia fechada A e C; as novas waltherionas de cadeia aberta R-T, que são derivados recentemente descobertos das waltherionas de cadeia aberta; dois novos derivados da waltheriona C; waltherionas de cadeia fechada U-V; 13-metoxi-waltheriona V; flavonoides; quatro alcaloides ciclopeptídicos, adoutinas X, Y, Y1 e Z. Um estudo recente que investigou as atividades leishmanicida e antimicrobiana dos alcaloides 4-quinolônicos do caule da *Waltheria indica* identificou as seguintes substâncias: waltheriona A, waltheriona B, waltheriona C, waltheriona G, waltheriona H, waltheriona J, waltheriona L, waltheriona P, chamaedrona, 8-deoxi-antidesma, antidesmona e, pela primeira vez, N-metóxi-waltheriona A (SILVA et al., 2022).

1.4 OBJETIVO

1.4.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ O objetivo geral deste estudo foi avaliar os potenciais farmacodinâmico e farmacocinético das waltherionas ciclizadas A, B, C e D como possíveis candidatos a fármacos de uso oral frente à COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, por meio de ferramentas computacionais.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Fazer os desenhos das estruturas químicas em 3D das waltherionas A, B, C e D e de candidatos a fármaco frente à COVID-19 que estão sendo estudados na literatura científica e otimizá-las;
- ✓ Avaliar o potencial farmacodinâmico das waltherionas A, B, C e D realizando o *docking* molecular de todas as estruturas químicas (waltherionas e controles) com a $3CL^{pro}$/M^{pro} do SARS-CoV-2 para comparação dos perfis de interação com o sítio ativo e as energias de interação;
- ✓ Estimar as propriedades farmacocinéticas, isto é, as características de absorção, distribuição, metabolização/biotransformação, eliminação e toxicológicas (ADMET), das waltherionas A, B, C e D;
- ✓ Fazer um levantamento de artigos relacionados a candidatos à fármaco para COVID-19, *docking* molecular, previsão ADMET e sobre a química das waltherionas na literatura.

1.5 METODOLOGIA

1.5.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Foi conduzido um levantamento bibliográfico considerando o intervalo de tempo entre dezembro de 2019 e maio de 2023 utilizando as bases de dados Google Acadêmico, *PubMed Central*, *Science Direct*, *Science.gov* e *WorldWideScience* nos idiomas inglês e português. Foram utilizados os descritores em inglês, em função da maior prevalência de informações sobre esse tema em língua inglesa, e seus correspondentes em português: *waltheriones*, SARS-CoV-2, *molecular docking*, M^{pro} *inhibitors*, *in silico studies*, ADMET *predictions* e *druglikeness*. As palavras-chave foram pesquisadas isoladamente e em associação.

Dada à contemporaneidade do tema, foram priorizados artigos publicados nos últimos 4 anos. Entretanto, quando necessário, artigos mais antigos foram selecionados em função da relevância de alguma técnica, programa ou fundamento teórico relacionado ao *docking* molecular e previsões ADMET.

1.5.2 PREVISÃO ADMET E PERFIL DRUG-LIKENESS

Esta etapa do trabalho envolveu a previsão das propriedades farmacocinéticas e de toxicidade. Este estudo é chamado, neste contexto, pelo termo “ADMET”, que faz referência às quatro etapas em que a farmacocinética costuma ser didaticamente dividida, isto é, absorção, distribuição, metabolização e eliminação, além de parâmetros de toxicidade (GUAN et al., 2019).

As características de absorção, distribuição, metabolização/biotransformação e eliminação, assim como alguns parâmetros de toxicidade e o perfil *druglikeness* das waltherionas, foram previstos com o emprego de três ferramentas gratuitas frequentemente utilizadas para esta finalidade na literatura levantada: pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015), PreADMET (“ADME - PreADME/Tox”, 2020) e SwissADMET (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) – este último sendo particularmente interessante por fornecer o gráfico *boiled-egg* e o radar de biodisponibilidade oral para as moléculas testadas.

Para utilizar as ferramentas citadas, foi o feito o *upload* dos respectivos arquivos no formato .mol das waltherionas A, B, C e D. Os parâmetros relevantes foram elencados com base em uma revisão de literatura, selecionando artigos que fizeram

previsão ADMET utilizando essas ferramentas (ARAÚJO et al., 2021; PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015; VARDHAN; SAHOO, 2020; VUONG et al., 2020).

Os dados obtidos com as previsões nas três plataformas foram organizados em forma de tabela para que fosse feita a análise e comparação dos dados obtidos com cada uma. Adicionalmente, foram gerados os gráficos *boiled-egg* e os radares de biodisponibilidade oral para cada uma das waltherionas com o auxílio do SwissADME. O primeiro tem a finalidade de proporcionar um recurso visual para avaliar a capacidade de absorção através do trato gastrintestinal (TGI) e penetração da barreira hematoencefálica (BHE) – incluindo afinidade pela glicoproteína P, uma glicoproteína transmembrana transportadora de grande relevância para o transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica – enquanto o segundo mostra a disposição dos valores relativos às principais características físico-químicas (peso molecular, polaridade, log P e solubilidade em água), mostrando se estes se encaixam dentro de uma faixa que confere à molécula propriedades farmacocinéticas desejáveis para apresentar uma boa biodisponibilidade quando administrada por via oral em humanos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

1.5.3 PREPARAÇÃO DOS LIGANTES – MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO

As estruturas moleculares das waltherionas foram desenhadas com os *softwares* ArgusLab (THOMPSON, 2004) e Avogadro (HANWELL et al., 2016). Os códigos SMILES (WEININGER, 1988) registrados na base de dados PubChem (KIM et al., 2016) foram utilizados como base para o desenho das estruturas após conversão para o formato .mol2 com o programa OpenBabel (O'BOYLE et al., 2011), a partir do qual foram feitas as devidas correções com respeito às configurações dos centros quirais, informação que pode ser perdida quando uma estrutura 3D é gerada desta forma.

O mesmo procedimento descrito previamente foi adotado para um grupo de moléculas controle cuja afinidade pela $3CL^{pro}/M^{pro}$ já havia sido relatada na literatura (ARAÚJO et al., 2021; CHHETRI et al., 2021; UMAR et al., 2021; VARDHAN; SAHOO, 2020): atazanavir, darunavir, favipiravir e remdesivir. Estes fármacos serviram como parâmetros de comparação para avaliar o perfil de interações intermoleculares entre o ligante e o sítio ativo, as energias de interação e constantes de inibição das waltherionas. O ligante complexado com a estrutura cristalográfica também foi

utilizado como controle – ligante K36 na estrutura de código PDB:7k0e e o nirmatrelvir na estrutura de código PDB:7tll.

Todas as estruturas foram otimizadas com o *software* ArgusLab utilizando o cálculo por mecânica quântica e método semi-empírico PM3 (THOMPSON, 2004). O processo de otimização teve por finalidade estabilizar as estruturas moleculares dos ligantes, de modo a obter o vale de energia mais próximo na superfície de energia potencial e a geometria mais favorável para a molécula. Contudo, vale ressaltar que não é possível, apenas com o método empregado, garantir que este é, de fato, o menor valor de energia em toda a superfície de energia potencial. Para tal, seria necessário conduzir uma análise de frequência vibracional, de modo a confirmar que os vales de energia obtidos para as estruturas correspondem aos menores vales de energia em todas as superfícies de energia potencial das moléculas (ARAÚJO et al., 2021).

No entanto, a limitação em questão não compromete o presente estudo, uma vez que as conformações bioativas – aquelas induzidas pela interação ligante-receptor – não correspondem necessariamente às conformações mais estáveis em termos eletrônicos, conformacionais e termodinâmicos.

Subsequentemente, as estruturas dos ligantes foram convertidas para o formato .pdb, a partir do qual foram removidos os hidrogênios e adicionados somente os polares com o auxílio do programa *Discovery Studio Visualizer* (“Assault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment”, 2020). O arquivo .pdb foi então alterado no programa *MGLTools* do *AutoDockTools* (MORRIS et al., 2012), com o qual foram adicionadas as cargas de *Gasteiger* – tipo de carga mais adequada para ligantes – e identificados os ângulos de torsão e o número de ligações rotacionáveis, resultando na conversão para o formato .pdbqt, que é o apropriado para o procedimento de *docking* (MORRIS et al., 2012; TROTT; OLSON, 2010).

1.5.4 PREPARAÇÃO DA $3CL^{PRO}$/M^{PRO} E FORMAÇÃO DO COMPLEXO LIGANTE-RECEPTOR

A estrutura cristalográfica tridimensional da proteína alvo foi extraída da base de dados *Protein Data Bank* (ROSE et al., 2017) no formato .pdb. Os códigos das estruturas utilizadas foram PDB:7k0e, na qual a M^{pro} encontra-se complexada com o ligante K36, e PDB:7tll, na qual a M^{pro} da variante ômicron está complexada com o ligante nirmatrelvir. Os arquivos foram modificados no programa *Discovery Studio*

Visualizer (“Assault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment”, 2020), por meio do qual as moléculas de água, íons e moléculas complexadas foram removidos com o objetivo de prevenir interferências no procedimento de *docking*.

Em seguida, novamente com o auxílio do programa *MGLTools* do *AutoDockTools* (MORRIS et al., 2012), foram adicionados os hidrogênios polares e as cargas de *Kollman* – tipo de carga mais adequado para peptídeos. O arquivo foi então salvo no formato .pdbqt e selecionado como a macromolécula alvo para o procedimento de *docking*.

O ligante no formato .pdbqt foi inserido com o arquivo do alvo macromolecular ainda aberto. Foram definidas as coordenadas do ligante (obtidas do ligante complexado com a M^{pro} extraída do PDB) para a estrutura cristalográfica de código PDB:7k0e (DAMPALLA et al., 2021): x = 8. 827310, y = 22.558172, z = 27.322000; e para a estrutura de código PDB:7tll (GREASLEY et al., 2022), proveniente da variante ômicron do SARS-CoV-2 e utilizada em um estudo recente (HORCHANI et al., 2022): x = -2.289171, y = -0.904857, z = 13.696486. Foram determinadas as dimensões da *GridBox*, ajustando o seu tamanho de modo que nenhum dos ligantes selecionados ultrapassasse os seus limites, chegando então aos valores: 14:20:13, para os eixos x, y e z, respectivamente, para as duas *GridBox*.

1.5.5 REDOCKING (VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA) E DOCKING

A metodologia empregada para conduzir os *dockings* foi a de 100 corridas independentes utilizando o AutoDock 4.2.6 e o algoritmo Lamarckiano para ligantes flexíveis (MORRIS et al., 2012). A proteína alvo foi mantida rígida e apenas aos ligantes foi conferida flexibilidade conformacional para o encaixe induzido. As coordenadas do ligante complexado foram utilizadas para posicionar os controles e as waltherionas no sítio ativo.

A metodologia foi validada com o procedimento de *redocking*. Este consiste em fazer um *docking* com o ligante cristalográfico complexado com a proteína alvo, de modo a identificar o grau de sobreposição do complexo gerado por *docking* com o originalmente extraído do *Protein Data Bank (PDB)*. Esta técnica tem por finalidade averiguar se a metodologia de docking empregada é de fato capaz de posicionar o ligante adequadamente no sítio de ligação da proteína alvo (TALLEI et al., 2020).

O método é considerado válido caso a diferença entre o valor do *Root Mean Square Deviation* (RMSD) do complexo após o redocking e do complexo

cristalográfico seja menor ou igual a 2Å. Este resultado mostra uma sobreposição espacial satisfatória entre o ligante cristalográfico em sua posição original e aquela resultante do cálculo do *docking*, o que indica que a metodologia empregada foi capaz de alocar adequadamente o ligante no seu sítio de ligação na proteína alvo (TALLEI et al., 2020).

Os estudos de *docking* foram analisados com a ferramenta *MGLTools* (MORRIS et al., 2012), abrindo o arquivo .dlg para averiguar os valores das energias e constantes de inibição, assim como gerar o complexo proteína-ligante resultante de cada *docking*. A constante de inibição foi calculada a partir da energia livre de interação através da fórmula Ki = e(ΔG/RT), onde R é a constante universal dos gases (1.985 × 10−3 kcal mol^{-1} K^{-1}) e T a temperatura (298,15K). O perfil de interações intermoleculares, diagramas 3D e 2D, e as superfícies de distribuição da densidade eletrônica e das ligações de hidrogênio foram visualizados com o programa *Discovery Studio Visualizer* (“Assault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment”, 2020).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PREVISÃO ADMET (PARÂMETROS DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLIZAÇÃO, ELIMINAÇÃO E TOXICOLÓGICOS)

2.1.1 SIMULAÇÕES *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS COM A FERRAMENTA SwissADME

As waltherionas A, B e C possuem massa molar inferior a 500 g mol^{-1}, ou seja, apresentam um baixo peso molecular, o que favorece a penetrabilidade através de membranas biológicas por difusão passiva (transporte transcelular). A waltheriona D é a única que possui um peso molecular acima de 500 g mol^{-1}. Os valores de TPSA (do inglês "*topological polar surface area*", ou "superfície de área polar topológica"), um parâmetro que representa a soma das contribuições dos átomos polares (oxigênios, nitrogênios e hidrogênios ligados a estes) para a área da superfície molecular, foram adequados para as waltherionas A, B e C, uma vez que todos estão abaixo de 120 $Å^2$, dado que sugere uma boa permeabilidade intestinal (GILLET; LEACH, 2007).

O valor do Log P (consenso) – compreendido aqui como o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água - das waltherionas A, B e C encontra-se entre 1 e 4, o que sugere um equilíbrio adequado entre as características hidrofílicas e lipofílicas para permitir, simultaneamente, a solubilização nos fluidos biológicos e a penetrabilidade pelas bicamadas lipídicas das membranas dos enterócitos, resultando, possivelmente, em uma absorção alta, produzindo uma biodisponibilidade adequada. A waltheriona D, por sua vez, apresentou um valor de Log P (consenso) muito baixo devido a sua alta polaridade, o que sugere uma baixa penetrabilidade por via transcelular (TRIGGLE; TAYLOR, 2007).

As waltherionas A, B e C seguiram todos os requisitos da regra de Lipinski, ao passo que a waltheriona D não cumpriu dois requisitos - excedeu a massa molar de 500 g mol^{-1} e possui mais de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (6 grupos doadores). Portanto, as três primeiras possuem propriedades físico-químicas desejáveis para uma boa biodisponibilidade por via oral (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros relacionados à absorção das waltherionas (SwissADME).

Substância	**Características de Absorção**				
	Massa Molar (MM) (g mol^{-1})	TPSA ($Å^2$)	Log P (Consenso)	Absorção pelo TGI	Conformidade com a Regra de Lipinski
waltheriona A	393.43	80,78	2.95	Alta	Sim - nenhuma violação
waltheriona B	393.43	80.78	2.98	Alta	Sim - nenhuma violação
waltheriona C	347.41	51.32	3.74	Alta	Sim - nenhuma violação
waltheriona D	511.52	161.7	0.99	Baixa	Não - duas violações

Fonte: O Autor. MM: massa molar; PSA: *polar surface área* – superfície de área polar; Log P: log do coeficiente de partição octanol/água (P); TGI: trato gastrointestinal.

A única waltheriona que apresentou resultado positivo para a permeabilidade pela barreira hematoencefálica (P_{BHE}) foi a waltheriona C e todas elas deram resultado positivo para substrato da glicoproteína P. A maior permeabilidade da waltheriona C pela BHE deve-se à ausência do grupo hidroxila e de um grupo metoxila a menos, diminuindo consideravelmente a sua polaridade – e consequentemente diminuindo o valor de log P. Os gráficos *boiled-egg* de cada uma delas, que podem ser observados a seguir, mostram essas características.

As waltherionas A e B, de acordo com a simulação realizada, podem inibir as CYPs 2C9, 2D6 e 3A4, e a waltheriona C pode inibir as CYPs 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4. A waltheriona D não inibiu nenhuma CYP (Tabela 2). Este dado é importante, tendo em vista que a inibição dessas CYPs pode levar a interações medicamentosas com outros fármacos que são metabolizados por elas, aumentando as suas concentrações plasmáticas, levando a potenciais efeitos adversos.

Tabela 2 – Parâmetros relacionados ao metabolismo/biotransformação e à distribuição das waltherionas (SwissADME)

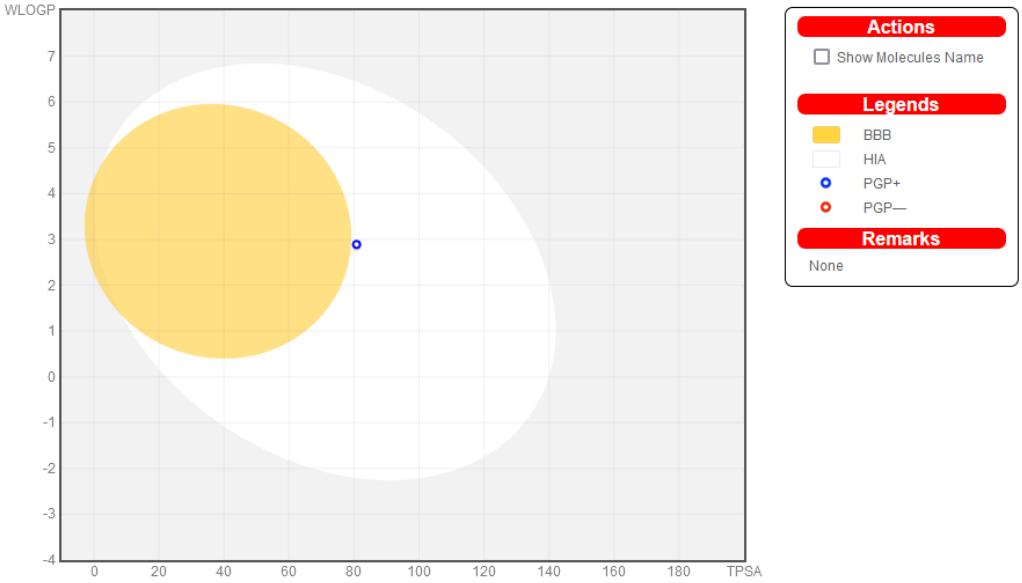
Substância	**Características de Distribuição e Metabolismo**		
	P_{BHE}	Substrato da Glicoproteína P (P-gp)	CYPs Inibidas
waltheriona A	Não permeável	Sim	2C9, 2D6 e 3A4
waltheriona B	Não permeável	Sim	2C9, 2D6 e 3A4
waltheriona C	Permeável	Sim	1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4
waltheriona D	Não permeável	Sim	Não inibe as CYPs

Fonte: O autor; P_{BHE}: permeabilidade da barreira hematoencefálica; CYP: citocromo.

Como é possível observar nos radares de biodisponibilidade a seguir (gráficos 2 e 4), todas as propriedades físico-químicas relevantes das waltherionas A e B encontraram-se dentro da faixa apropriada. Este dado corrobora para o perfil *druglikeness* e, desta forma, indica que esta substância pode apresentar uma biodisponibilidade oral adequada, sendo um bom candidato à fármaco por via oral em termos farmacocinéticos.

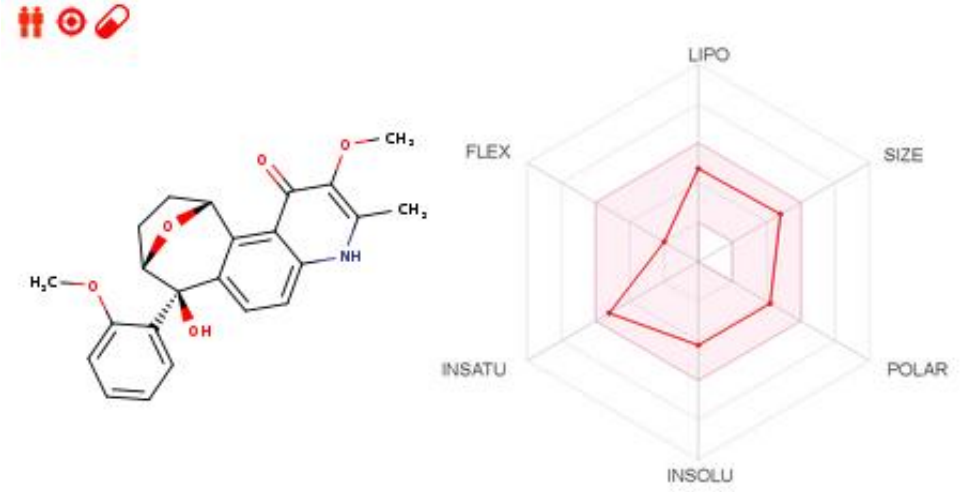
Ao analisar os gráficos *boiled-egg* (Gráficos 1 e 3), é possível constatar que as waltherionas A e B encontram-se quase que na região limítrofe para ter uma lipofilicidade suficiente para penetrar através da barreira hematoencefálica (BHE), isto é, quase entram na região amarela do gráfico. Entretanto, mesmo que elas sejam capazes de penetrar a BHE, as duas tiveram afinidade pela glicoproteína P. Deste modo, existe a possibilidade de transporte ativo dessas substâncias (bombeamento) para fora do sistema nervoso central (SNC) após penetração pela BHE.

Gráfico 1 - Gráfico *boiled-egg* da waltheriona A gerado pelo SwissADME



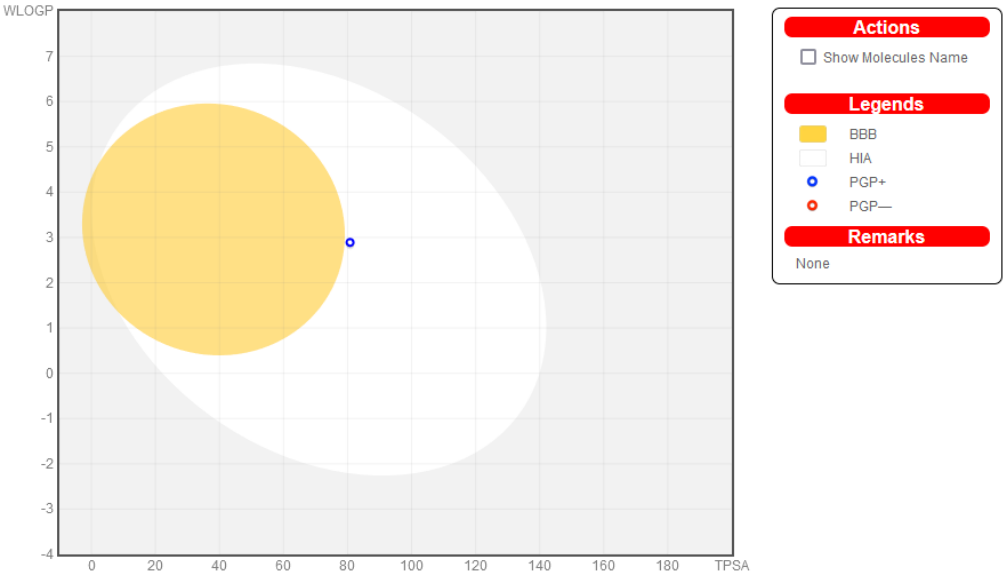
Fonte: O Autor.

Gráfico 2 - Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona A gerado pelo SwissADME



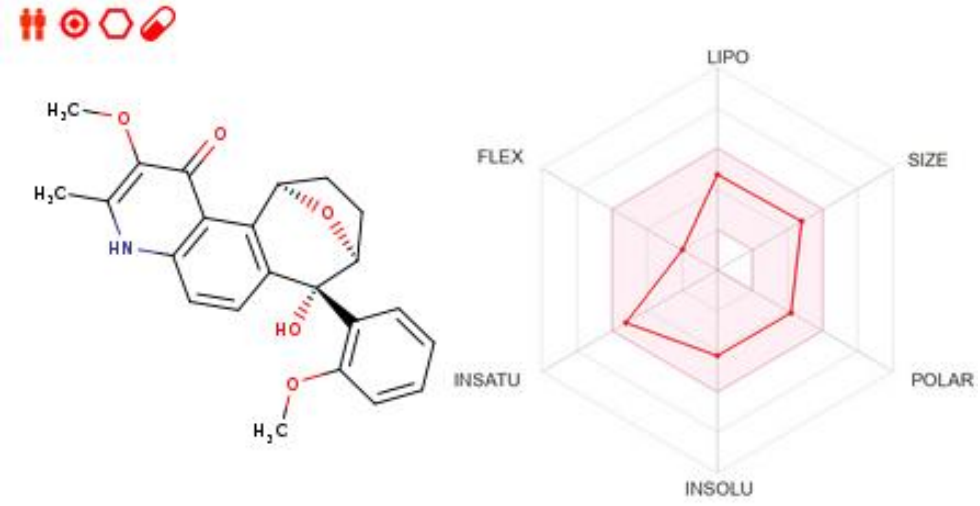
Fonte: O Autor.

Gráfico 3 - Gráfico *boiled-egg* da waltheriona B gerado pelo SwissADME



Fonte: O Autor.

Gráfico 4 - Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona B gerado pelo SwissADME



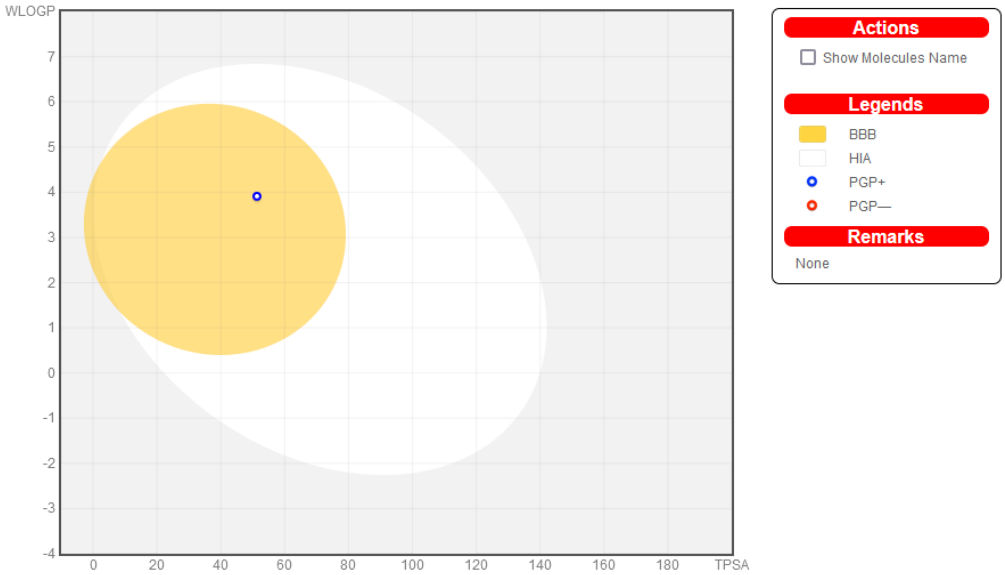
Fonte: O Autor.

Tal como é possível constatar, a waltheriona C foi a única que se encontrou dentro da região mais lipofílica do gráfico, indicando potencial de penetração através da barreira hematoencefálica (BHE) (Gráfico 5). Entretanto, o gráfico também indica que a waltheriona C é substrato da glicoproteína P. Portanto, mesmo que ela seja capaz de penetrar através da barreira hematoencefálica, existe a possibilidade da mesma ser bombeada (transportada para fora do sistema nervoso central por transporte ativo) de volta para a corrente sanguínea.

O gráfico em radar (Gráfico 6) mostra que as propriedades físico-químicas relevantes da waltheriona C também se encontraram dentro das faixas de valores

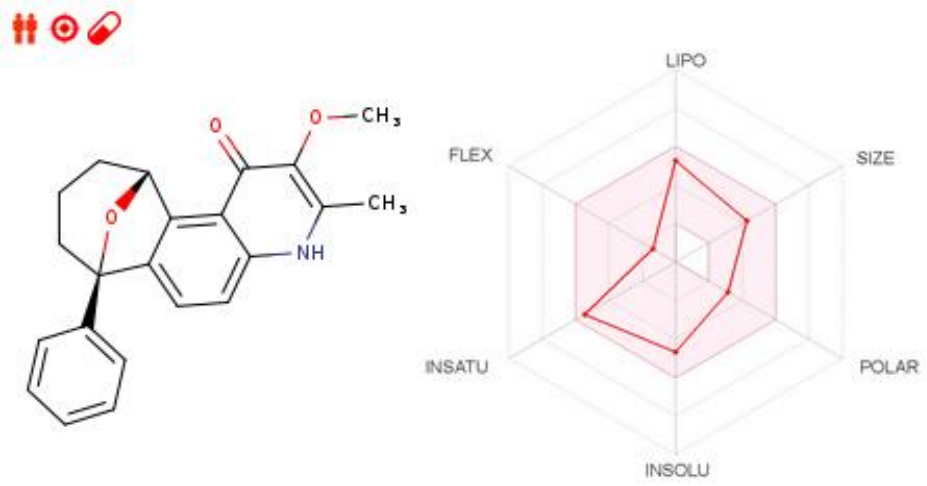
adequadas para conferir à molécula uma boa biodisponibilidade e um perfil *druglikeness* apropriado.

Gráfico 5 - Gráfico *boiled-egg* da waltheriona C gerado pelo SwissADME



Fonte: O Autor.

Gráfico 6 - Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona C gerado pelo SwissADME

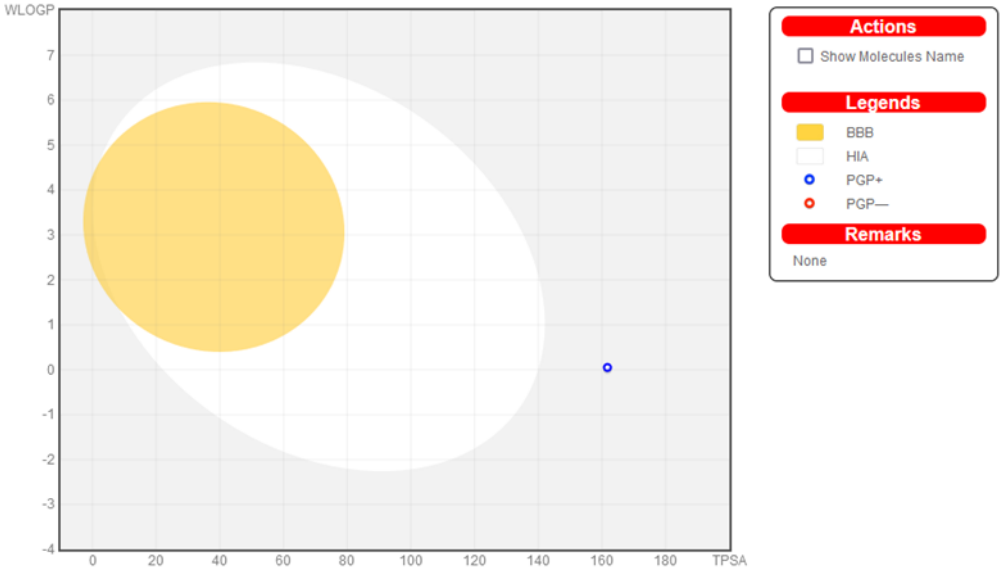


Fonte: O Autor.

A waltheriona D, devido a sua maior polaridade, decorrente do esqueleto de carboidrato na sua estrutura molecular, apresentou valores de peso molecular e polaridade acima daqueles que seriam adequados para uma molécula orgânica pequena, como é possível observar pelo alto valor TPSA - do inglês "*topological polar surface area*", ou seja, o valor total da área conferida pelos átomos polares que

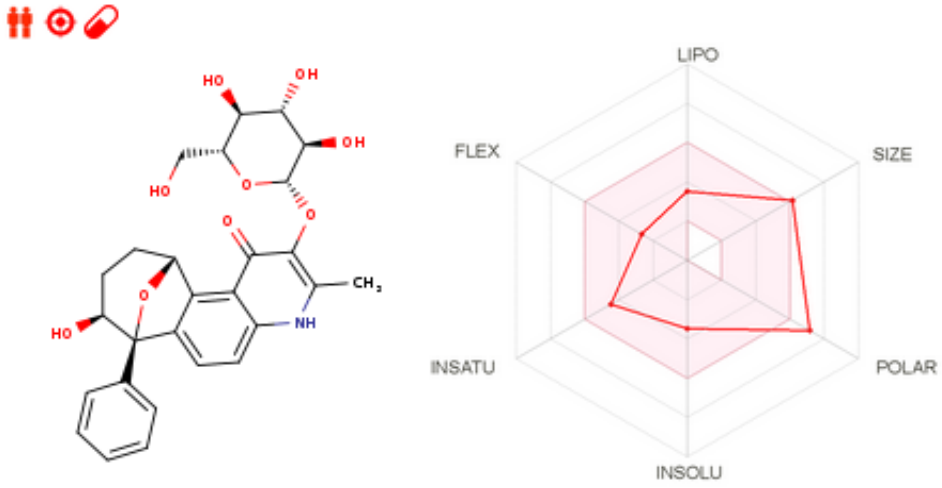
compõem a estrutura molecular (nitrogênio, oxigênio e hidrogênios ligados a estes). Isto significa que ela provavelmente não seria uma substância interessante do ponto de vista farmacocinético. O gráfico *boiled-egg* (Gráfico 7) mostra que a waltheriona D está fora da região de lipofilicidade mínima para penetrar a membrana plasmática dos enterócitos (região em branco). O radar de biodisponibilidade (Gráfico 8) mostra que as características de polaridade excedem a faixa de referência e o tamanho da molécula encontra-se no ponto limítrofe.

Gráfico 7 - Gráfico *boiled-egg* da waltheriona D gerado pelo SwissADME



Fonte: O Autor.

Gráfico 8 - Radar de biodisponibilidade oral da waltheriona D gerado pelo SwissADME



Fonte: O Autor.

2.1.2 SIMULAÇÕES *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS COM A FERRAMENTA PreADME

Os valores de log P calculados com esta plataforma corroboram com os resultados encontrados com a anterior, com as waltherionas A, B e C dentro da faixa desejável (log P entre 1 e 4) para conferir, simultaneamente, solubilidade nos fluídos biológicos e penetrabilidade através das bicamadas lipídicas das membranas celulares (TRIGGLE; TAYLOR, 2007). Esta afirmação é reforçada pelos valores obtidos para solubilidade em água pura e para o potencial de absorção intestinal humana (HIA). O valor de $P_{Caco\text{-}2}$, neste caso, não pode ser utilizado para estimar a absorção intestinal humana, uma vez que não é possível correlacioná-lo com o potencial de absorção intestinal humana (HIA, do inglês "*Human Intestinal Absorption*") quando o $P_{Caco\text{-}2}$ é inferior a 5.6×10^{-6} cm s^{-1} – o maior valor encontrado foi o da waltheriona C, que apresentou um $P_{Caco\text{-}2}$ de 4.8×10^{-6} cm s^{-1} (Tabela 3) (REN; LIEN, 2000).

Tabela 3 - Parâmetros relacionados à absorção das waltherionas (PreADME)

Substância	Características de Absorção			
	SKlogP (log_{10} de P)	Solubilidade em Água Pura (mg L^{-1})	HIA (%)	P_{Caco-2} (nm s^{-1})
waltheriona A	2.393	2.113	95.17	35.45
waltheriona B	2.393	2.113	95.17	35.45
waltheriona C	3.391	0.654	96.56	48.48
waltheriona D	0.261	6.325	77.09	17.96

Fonte: O Autor. SKlogP: valor de log P calculado pelo SK *atomic types*; HIA: *Human Intestinal Absorption Potential* – Potencial de Absorção Intestinal em Humanos; P_{Caco-2}: permeabilidade pelas células Caco-2.

Em termos de distribuição, a fração ligada a proteínas plasmáticas foi alta para as waltherionas A, B e C, já que todas tiveram um PPB ("*plasma protein binding*" ou "ligação a proteínas plasmáticas", em português) acima de 80% (SUN et al., 2018). A única substância para a qual o valor da razão entre as concentrações no cérebro e no plasma foi maior ou igual a 0.04 foi a waltheriona C (0.04 se o valor 0.0375 for aproximado), ou seja, esta é a única com algum potencial de penetrar a barreira hematoencefálica (Tabela 4) (EL REFAEY, 2007).

Tabela 4 - Parâmetros relacionados à distribuição das waltherionas (PreADME)

Substância	Características de Distribuição		
	PPB (%)	$C_{cérebro}/C_{plasma}$	Inibição da Glicoproteína P
waltheriona A	81.92	0.0162	Não
waltheriona B	81.92	0.0162	Não
waltheriona C	90.33	0.0375	Não
waltheriona D	51.37	0.0340	Não

Fonte: O Autor. PPB: *Plasma Protein Binding* – Ligação a Proteínas Plasmáticas; $C_{cérebro}/C_{plasma}$: coeficiente de partição cérebro/plasma.

No que tange à biotransformação, as waltherionas A, B, C e D inibiram as CYPs 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4. Ademais, todas foram substrato para a CYP 3A4. Entretanto, estes dados foram diferentes daqueles obtidos com o SwissADME (Tabela 5).

A informação de que as waltherionas podem ser substrato da CYP3A4 e ao mesmo tempo provocar a sua inibição é preocupante, uma vez que este processo de inibição pode levar a maiores concentrações plasmáticas do que o esperado, produzindo doses potencialmente tóxicas, aumentando a probabilidade de efeitos adversos.

Tabela 5 - Parâmetros relacionados à metabolização/biotransformação das waltherionas (PreADME)

Substância	**Características de Metabolismo/Biotransformação**					
	CYP2C19 (Inibição)	CYP2C9 (Inibição)	CYP2D6 (Inibição)	CYP2D6 (Substrato)	CYP3A4 (Inibição)	CYP3A4 (Substrato)
waltheriona A	Inibidor	Inibidor	Não	Não	Inibidor	Substrato
waltheriona B	Inibidor	Inibidor	Não	Não	Inibidor	Substrato
waltheriona C	Inibidor	Inibidor	Não	Não	Inibidor	Substrato
waltheriona D	Inibidor	Inibidor	Não	Não	Inibidor	Substrato

Fonte: O Autor. CYP = citocromo

Com respeito aos testes de toxicidade, apenas a waltheriona C deu um resultado positivo para o teste Ames de mutagenicidade. Este teste, também denominado “ensaio de mutação reversa de *Salmonella typhimurium*”, é um dos mais frequentemente utilizados na toxicologia. É empregado para a identificação de agentes carcinógenos utilizando a mutagenicidade da bactéria e o metabolismo de mamíferos para ativar agentes pró-mutagênicos. Isto é possível devido ao alto grau de correlação que foi encontrado entre a carcinogenicidade em animais e a mutagenicidade no teste de Ames. Entretanto, vale ressaltar que essa correlação, apesar de significativa, não é completa/total (Tabela 6) (FÖLLMANN et al., 2013).

Tabela 6 - Parâmetros relacionados à toxicidade das waltherionas (PreADME)

Substância	**Carcinogenicidade**		
	Teste Ames (Mutagenicidade)	Camundongos	Ratos
waltheriona A	Não mutagênico	Negativo	Negativo
waltheriona B	Não mutagênico	Negativo	Negativo
waltheriona C	Mutagênico	Negativo	Negativo
waltheriona D	Não mutagênico	Negativo	Negativo

Fonte: O Autor

2.1.3 SIMULAÇÕES *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS COM A FERRAMENTA pkCSM

A solubilidade em água pode ser medida pelo LogS, que consiste no logaritmo na base 10 da concentração do fármaco em mol L^{-1}. Quando este valor se encontra entre 0 e -4, a substância provavelmente possui o equilíbrio desejado entre as características hidrofílicas, para solubilização nos fluídos biológicos, e hidrofóbicas, para penetração através das membranas. O percentual de absorção intestinal foi alto para as waltherionas A, B e C (>90%). Assim como nos cálculos feitos para a P_{Caco2} feitos no PreADME, os valores obtidos com o pkCSM foram abaixo de 5.6×10^{-6}, de modo que não é possível fazer uma correlação entre a P_{Caco2} e a absorção intestinal (REN; LIEN, 2000). Como esperado, os valores de volume de distribuição seguiram a tendência da fração não ligada, tendo em vista que, quanto maior é a fração não ligada, menor é o volume de distribuição (Tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros relacionados à absorção das waltherionas (pkCSM)

Substância	Características de Absorção		
	LogS (log Mol L^{-1})	Absorção Intestinal (em Humanos) (%)	P_{Caco2} (log Papp em 10^{-6} cm/s)
waltheriona A	-4.083	94.296	1.161
waltheriona B	-4.083	94.296	1.161
waltheriona C	-4.288	95.038	1.026
waltheriona D	-3.091	55.003	0.56

Fonte: O Autor. LogS: log da solubilidade em água em mol L^{-1}; $LogP_{Caco-2}$: permeabilidade pelas células Caco-2.

Os valores para a fração não ligada foram baixos, cerca de 10% para as waltherionas A, B e C (10.6% para as waltherionas A e B, e 9.3% para a waltheriona C), o que significa que a maior parte dessas substâncias permanece ligada a proteínas quando se encontram no plasma. A waltheriona C foi a única que apresentou permeabilidade pela barreira hematoencefálica. Ademais, as waltherionas A e B inibiram a glicoproteína P (Tabela 8).

Tabela 8 - **Parâmetros relacionados à distribuição das waltherionas (pkCSM)**

Substância	Características de Distribuição			
	Fração Não Ligada (Humanos) (Fu)	VDss (Humano) (log L Kg^{-1})	P_{BHE}	Inibidor da Glicoproteína P
waltheriona A	0.106	0.326	Não Permeável	Sim
waltheriona B	0.106	0.326	Não Permeável	Sim
waltheriona C	0.093	0.641	Permeável	Não (Glicoproteína P II apenas)
waltheriona D	0.021	-0.272	Não Impermeável	Sim

Fonte: O Autor. VDss: Volume de Distribuição; P_{BHE}: permeabilidade pela barreira hematoencefálica.

As waltherionas A, B e C inibiram as CYPs 3A4, 1A2, 2C19 e 2C9. Todas foram substrato para a CYP3A4. Apenas a waltheriona D não apresentou potencial para inibir qualquer uma das CYPs (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros relacionados à metabolização/biotransformação das waltherionas (pkCSM)

Substância	**Características de Metabolismo (Substratos e Inibidores)**				
	CYP2D6	CYP3A4	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9
waltheriona A	Não	Sim (Substrato e Inibidor)	Sim (Inibidor)	Sim (Inibidor)	Sim (Inibidor)
waltheriona B	Não	Sim (Substrato e Inibidor)	Sim (Inibidor)	Sim (Inibidor)	Sim (Inibidor)
waltheriona C	Não	Sim (Substrato e Inibidor)	Sim (Inibidor)	Sim (Inibidor)	Sim (Inibidor)
waltheriona D	Não	Substrato	Não	Não	Não

Fonte: O Autor. CYP: citocromo.

Todas as waltherionas deram resultado negativo para o teste de Ames, em contraponto ao resultado obtido com o PreADME. O único resultado que seria clinicamente relevante foi o teste de hepatotoxicidade, que foi positivo para as waltherionas A, B e C (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros relacionados à toxicidade das waltherionas (pkCSM)

Substância	**Características de Toxicidade**				
	Mutagenicidade (teste Ames)	Toxicidade oral aguda em ratos, LD 50 (mol Kg^{-1})	Toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL) (log Kg^{-1} dia^{-1})	Hepatotoxicidade	Reação de Sensibilidade Cutânea
waltheriona A	Negativo	2.523	1.683	Sim	Não
waltheriona B	Negativo	2.523	1.683	Sim	Não
waltheriona C	Negativo	2.786	1.53	Sim	Não
waltheriona D	Negativo	2.735	2.863	Não	Não

Fonte: O Autor. LD50: *lethal dose* - dose letal 50%; LOAEL*: lowest observed adverse effect level* – menor dose necessária para causar efeitos adversos.

2.1.4 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS TRÊS PLATAFORMAS

As análises mostraram que as waltherionas A, B e C possuem boas características de absorção, uma vez que as massas molares são inferiores a 500 g mol^{-1}, possuem características de polaridade equilibradas – não são muito hidrofílicas nem muito lipofílicas, tal como pode ser observado pelos valores de TPSA, log P e log S – e seguem a regra de Lipinski, o que sugere um bom perfil de biodisponibilidade oral. Adicionalmente, pode-se constatar que nenhuma delas possui propriedades físico-químicas que ultrapassam os limites do radar de biodisponibilidade. Portanto, a absorção através do trato gastrintestinal (TGI), de acordo com estes dados, provavelmente seria alta, resultando em um alto percentual de absorção intestinal (HIA, do inglês *human intestinal absorption,* ou absorção intestinal humana, em português).

Em contrapartida, a waltheriona D, por sua vez, possui um alto peso molecular (acima de 500 g mol^{-1}), é excessivamente polar para uma molécula orgânica pequena (principalmente em função do esqueleto de carboidrato que possui em sua estrutura química) e não segue a regra de Lipinski. Consequentemente, a absorção através do

trato gastrintestinal provavelmente é baixa, levando a um percentual de absorção intestinal baixo e uma biodisponibilidade por via oral insatisfatória.

Em termos de distribuição, foi previsto que as waltherionas A, B e C, provavelmente, encontram-se majoritariamente ligadas a proteínas plasmáticas (>80%). Apenas a waltheriona D apresentou uma baixa interação com as proteínas plasmáticas (pouca afinidade).

Nenhuma delas inibe a glicoproteína P, mas todas são seus substratos. A waltheriona C é a única que apresentou potencial de penetração da barreira hematoencefálica, tal como pode ser visto no gráfico *boiled-egg* e pelo valor de P_{BHE}.

Os resultados referentes à metabolização variaram de acordo com a plataforma utilizada, então não foi possível tirar conclusões com relação aos valores obtidos com as previsões. Seria adequado fazer outras previsões *in sílico* e testes *in vitro* para dar maior sustentação aos resultados.

As propriedades toxicológicas mostraram-se, em sua maioria, relativamente positivas. Os testes Ames de todas as waltherionas, exceto a C, deram resultado negativo, sugerindo que esta é a única das waltherionas testadas que teria potencial mutagênico. Os testes de carcinogenicidade em camundongos e ratos foram negativos para todas as waltherionas. Nenhuma mostrou sensibilidade cutânea. No entanto, as waltherionas A, B e C mostraram potencial hepatotóxico.

2.2 *REDOCKING*

2.2.1 VALIDAÇÃO DA METADOLOGIA DE DOCKING COM A ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7K0E COMPLEXADA COM O LIGANTE K36

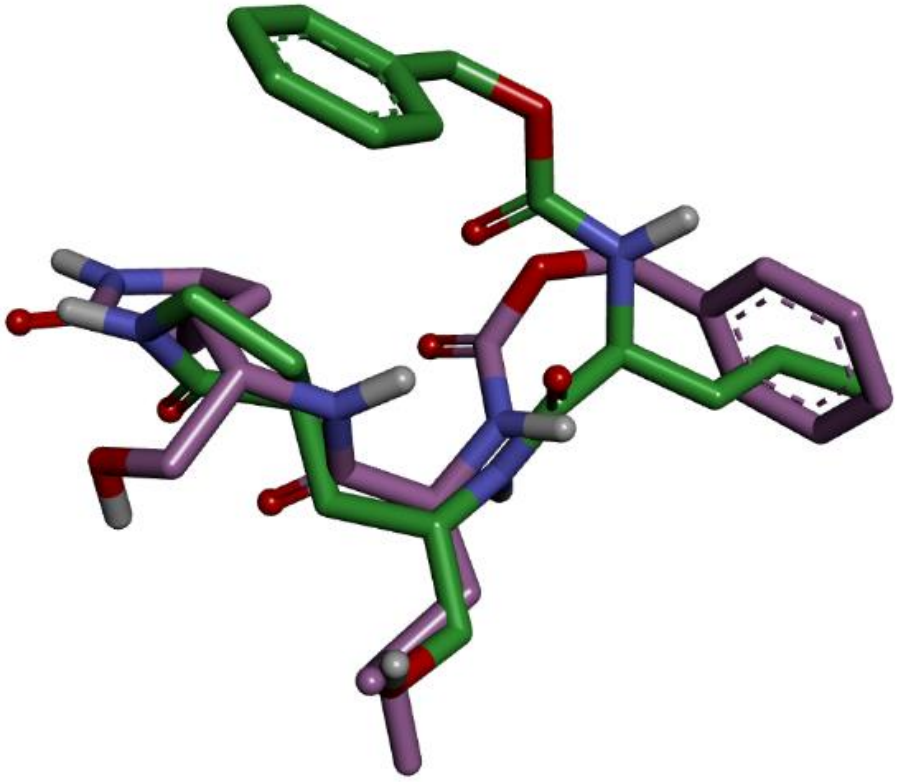
O valor de RMSD obtido para o complexo de menor energia, após análise das conformações do ligante por *cluster* gerado pelo *redocking*, foi de 2.58Å. Como o valor da resolução do complexo cristalográfico extraído do PDB foi de 1.90Å (DAMPALLA et al., 2021), a diferença entre esses valores é de 0,68Å. Portanto, como essa diferença foi menor que 2Å, a metodologia foi considerada válida para dar prosseguimento às simulações de docking com o tamanho de *GridBox* proposto, tal como critério apontado previamente na metodologia (TALLEI et al., 2020).

Ademais, foi feita a sobreposição espacial, ou *molecular overlay* em inglês, com o auxílio do programa *Discovery Studio Visualizer* (“Assault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment”, 2020). Este procedimento permitiu a justaposição do complexo gerado por *docking* com o complexo receptor-ligante

extraído do PDB, permitindo a comparação da posição do ligante cristalográfico com aquela do mesmo ligante após o *docking*.

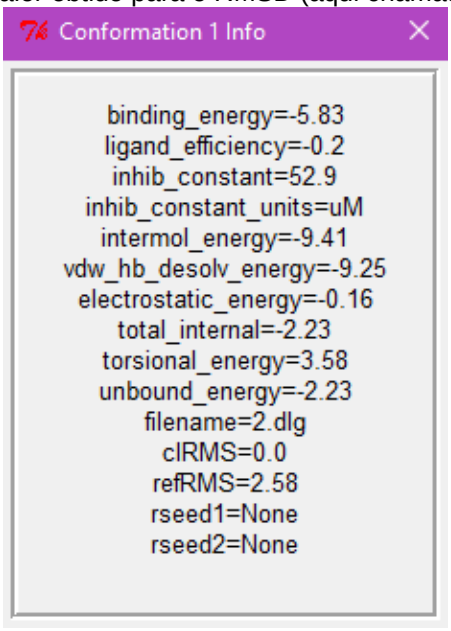
Constatou-se que o ligante foi apropriadamente alocado no sítio de ligação, previsto pelas coordenadas fornecidas pela estrutura cristalográfica, com a metodologia empregada neste trabalho. Pode-se observar este resultado na figura 4, na qual a molécula cuja cadeia carbônica está com a coloração verde é o ligante cristalográfico, e a outra, cuja cadeia carbônica apresenta a coloração roxa, consiste no ligante posicionado pelo processo de *redocking*.

Figura 4: Resultado da superposição do ligante cristalográfico K36 antes e após o *redocking* (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor.

Figura 5: Informações sobre a conformação de menor energia do cluster gerado por *docking*, mostrando o valor obtido para o RMSD (aqui chamado de refRMS)



Fonte: O Autor.

2.2.2 VALIDAÇÃO DA METADOLOGIA DE DOCKING COM A ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7TLL COMPLEXADA COM O LIGANTE NIRMATRELVIR

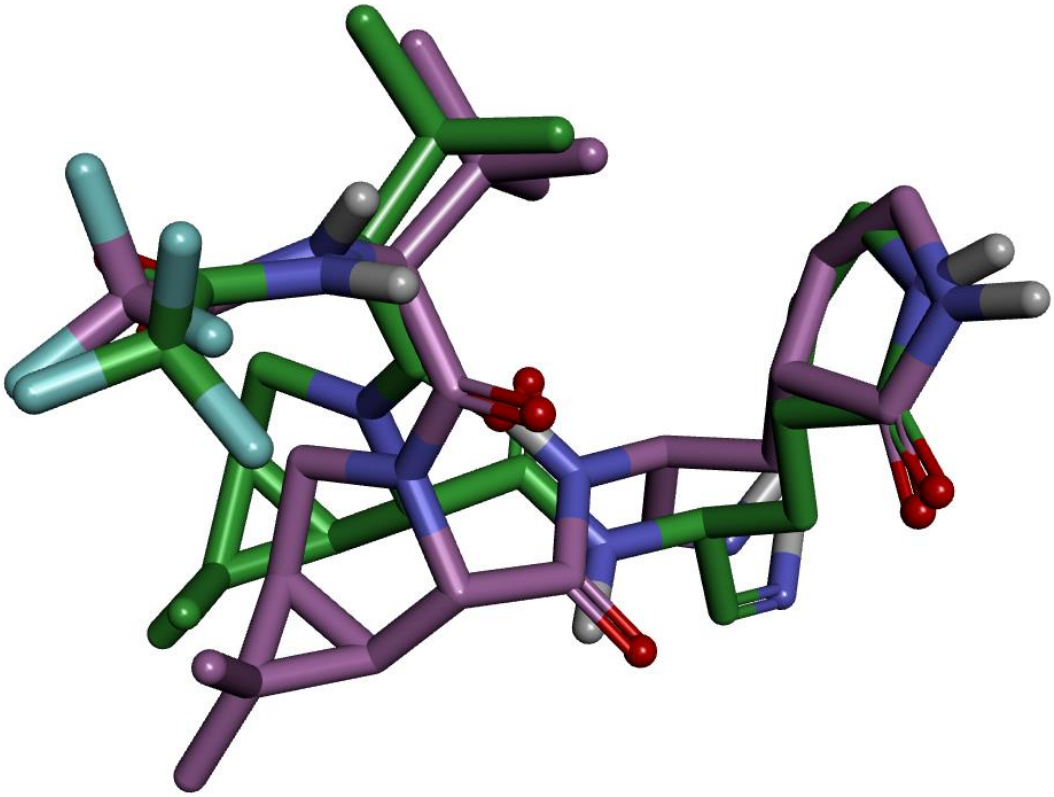
O valor de RMSD obtido para o complexo de menor energia, após análise das conformações por *cluster* gerado pelo procedimento de *redocking*, foi de 1.39Å. Como a resolução do complexo cristalográfico extraído do PDB é de 1.63Å (GREASLEY et al., 2022), a diferença entre os dois valores foi de 0.24Å. Consequentemente, como esse valor foi menor do que 2Å, a metodologia empregada neste estudo, levando em consideração o tamanho proposto para a *GridBox*, foi considerada válida para prosseguir com as simulações de *docking* utilizando outros ligantes (TALLEI et al., 2020).

Foi realizada a sobreposição espacial (*molecular overlay* em inglês) utilizando a ferramenta *Discovery Studio Visualizer* (“Assault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment”, 2020). Este procedimento permitiu a justaposição do complexo de menor energia gerado por *docking* com aquele complexo receptor-ligante do arquivo extraído do PDB, permitindo a comparação das posições do ligante cristalográfico, ou seja, antes do *docking* ser conduzido, com a do ligante após o *docking*.

Observou-se que o ligante foi adequadamente posicionado no sítio de ligação previsto pelas coordenadas da estrutura cristalográfica com a metodologia aplicada

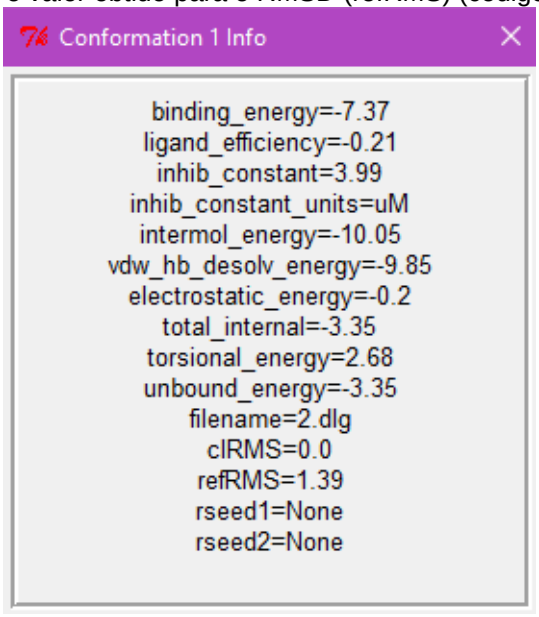
neste trabalho. O resultado da sobreposição molecular pode ser constatado na figura 6, onde a molécula cuja cadeia carbônica apresenta cor verde é o nirmatrelvir cristalográfico, enquanto a molécula com cadeia carbônica de cor roxa é o nirmatrelvir posicionado pelo *redocking*.

Figura 6: Resultado da superposição do ligante cristalográfico nirmatrelvir antes e após o redocking (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor.

Figura 7: Informações sobre a conformação de menor energia do cluster gerado por docking, mostrando o valor obtido para o RMSD (refRMS) (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor.

2.3 *DOCKING*

2.3.1 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE O SÍTIO ATIVO DA M^{PRO}

A região do sítio de ligação da $3CL^{pro}/M^{pro}$ encontra-se no sítio catalítico caracterizado pelos resíduos de aminoácido cisteína 145 (Cys^{145}) e histidina 41 (His^{41}) (TAHIR UL QAMAR et al., 2020). Além desses dois aminoácidos, que constituem uma díade catalítica essencial para a formação de ligação covalente com o ligante natural da enzima (peptídeo N3), o sítio ativo é demarcado pelos aminoácidos: serina 46 (Ser^{46}), glutamina 189 (Gln^{189}), treonina 190 (Thr^{190}), alanina 191 (Ala^{191}), prolina 168 (Pro^{168}), ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}), leucina 141 (Leu^{141}) e asparagina 142 (Asn^{142}) (KNELLER et al., 2020a).

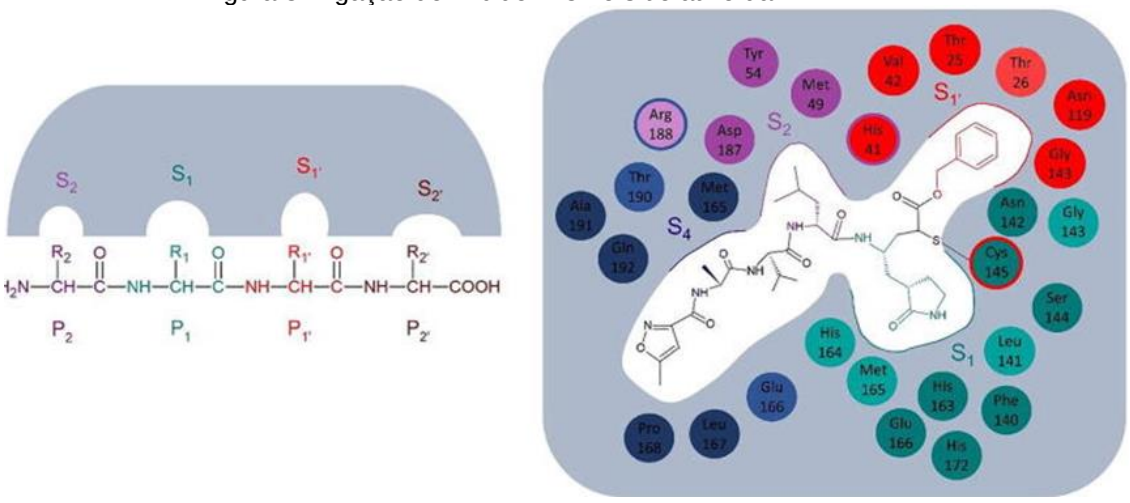
O glutamato 166 (Glu^{166}) tem um papel crítico na dimerização dos monômeros da M^{pro} do SARS-CoV-2 (WADANAMBI; JAYATHILAKA; SENEVIRATNE, 2023). Consequentemente, qualquer tipo de interação com esse aminoácido pode potencialmente obstruir a formação do homodímero funcional, causando a inibição da região catalítica.

Tendo em vista essas informações, a estratégia mais empregada para a identificação de potenciais inibidores da M^{pro} consiste na mimetização dos grupamentos do substrato peptídico da enzima e triagem virtual para buscar grupos funcionais que formem as interações mais energeticamente favoráveis para o

complexo. Desta maneira, a relação estrutura-atividade é elucidada e busca-se reproduzir o mecanismo de inibição do ligante natural da enzima, resultando no processo de inibição irreversível do alvo macromolecular por formação de ligação covalente estável (KNELLER et al., 2020b).

O inibidor peptídico N3 foi o ligante irreversível co-cristalizado mais frequentemente utilizado como referência para investigar potenciais candidatos a fármacos em estudos de *docking* molecular, sobretudo com a estrutura cristalográfica de código PDB:6LU7. Esta molécula é um aceptor de Michael, ou seja, o carbono β a um dos grupos carbonila constitui o sítio eletrofílico da reação de adição nucleofílica 1,4 (adição 1,4) que leva a um processo de inibição irreversível tempo-dependente (STODDARD et al., 2020). Tentamos utilizar esta estrutura co-cristalizada como referência para realizar o *docking*, mas, como não conseguimos validar a metodologia com ela, optamos por utilizar outras estruturas disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) (ROSE et al., 2017).

Figura 8: Ligação do inibidor N3 no sítio ativo da M^{pro}

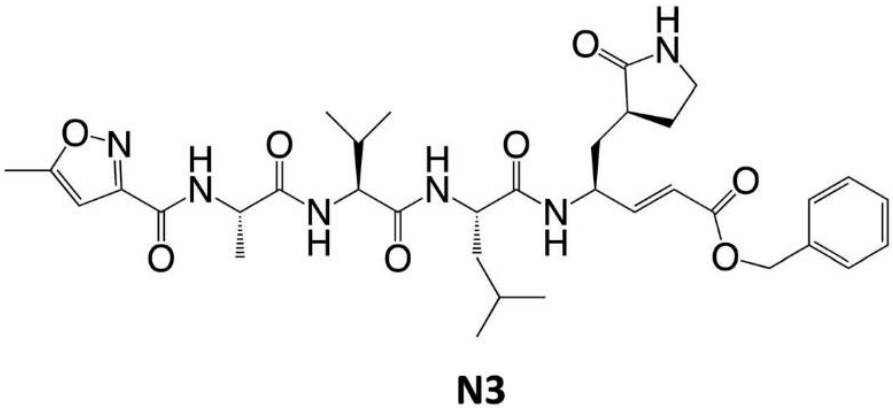


Fonte: Antonopoulou e colaboradores (2022) (Adaptado pelo Autor).

Um estudo de dinâmica molecular descreveu detalhadamente o mecanismo químico de inibição do ligante N3 (estrutura molecular ilustrada na figura 9) no sítio ativo da M^{pro} (ARAFET et al., 2021). De acordo com este trabalho, o nitrogênio básico do resíduo de histidina 41 (His^{41}), que apresenta uma carga parcial negativa considerável no átomo de nitrogênio em função da deslocalização eletrônica do anel de cinco membros (o fluxo de densidade eletrônica vai em direção a este nitrogênio), abstrai o hidrogênio ligado ao átomo de enxofre do resíduo de cisteína 145 (Cys^{145}).

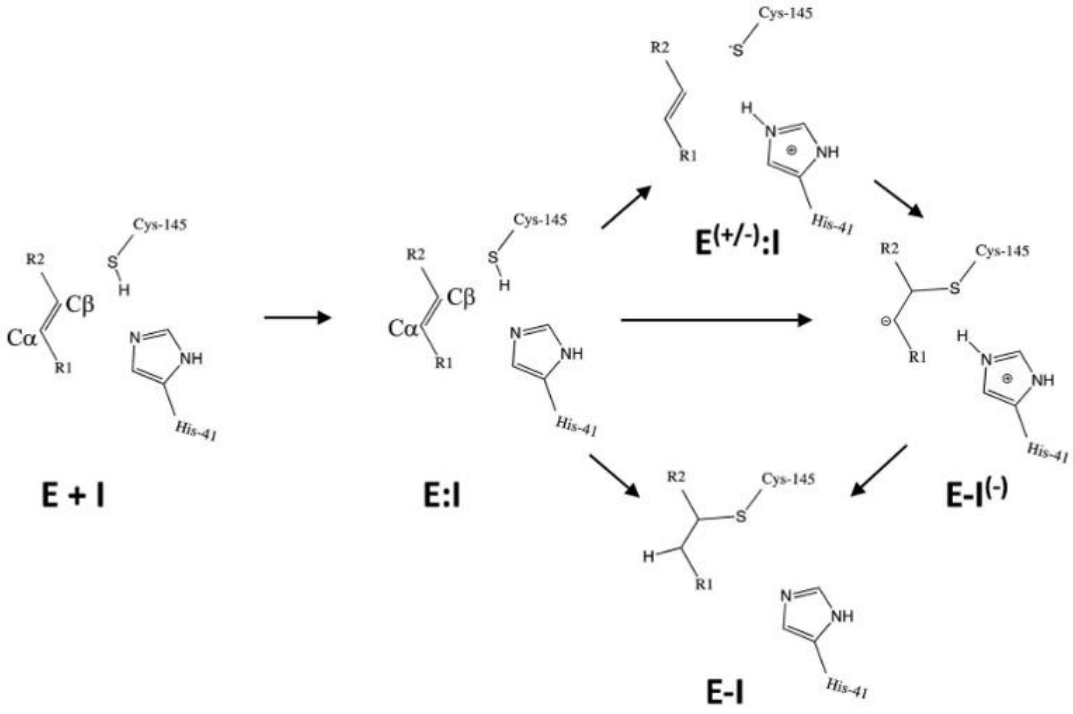
O átomo de enxofre negativamente carregado atua então como nucleófilo e ataca o átomo de carbono eletrofílico na posição β em relação ao grupo éster em uma das extremidades da molécula. Após o ataque nucleofílico do resíduo de Cys^{145}, o par de elétrons da insaturação vai para o carbono α, criando uma carga negativa. Este par de elétrons não ligante no carbono α o torna básico, de modo que o mesmo abstrai o próton do resíduo de His^{41}, formando o complexo receptor-ligante estável (mecanismo simplificado ilustrado na figura 10).

Figura 9: Estrutura molecular do ligante N3



Fonte: Arafet e colaboradores (2021).

Figura 10: Mecanismo químico de inibição irreversível da M^{pro} pelo ligante N3



Fonte: Arafet e colaboradores (2021).

Existe também a possibilidade de buscar por moléculas menores (não peptídicas) que apresentam outros modos de interação com o sítio ativo, tais como as interações não covalentes e alostéricas, produzindo uma inibição reversível da enzima. Nestes casos, apesar de ser mais difícil estabelecer o perfil de estrutura-atividade dos ligantes, em contrapartida, as propriedades farmacocinéticas geralmente são mais vantajosas e existe um menor risco de toxicidade – que resulta da menor seletividade dos ligantes irreversíveis (ANTONOPOULOU et al., 2022).

Deste modo, tendo em vista que a metodologia empregada neste estudo não é capaz de identificar a formação de ligações covalentes, além de não existir, até o momento, estrutura cristalográfica de um ligante que tenha uma alta similaridade estrutural com as waltherionas complexado com a M^{pro}, não foi possível investigar a possibilidade de formação da ligação σ com o resíduo de cisteína 145 (Cys^{145}) por adição nucleofílica 1,4 (adição conjugada ou reação de Michael) (ANTONOPOULOU et al., 2022). Contudo, tal fato não inviabilizou o estudo, tendo em vista a possibilidade de inibição da M^{pro} por meio de interações não covalentes (intermoleculares), produzindo uma inibição reversível da enzima, tal como previamente mencionado.

As interações não covalentes mais importantes para promover a inibição da M^{pro}, chamadas de “interações chave” no contexto dos estudos de química medicinal, são aquelas com os resíduos de ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}), histidina 41 (His^{41}), glicina 143 (Gly^{143}), serina 144 (Ser^{144}) e cisteína 145 (Cys^{145}), sendo as ligações de hidrogênio as mais particularmente relevantes (YOSHINO; YASUO; SEKIJIMA, 2020).

De acordo com Ogunyemi e colaboradores, a formação de ligações de hidrogênio ou outras interações não covalentes com um dos aminoácidos cisteína 145 (Cys^{145}) ou histidina 41 (His^{41}), ou ambos, sugere potencial atividade inibitória dentro do sítio ativo da M^{pro} (OGUNYEMI et al., 2021). Além disso, o resíduo de glicina 143 (Gly^{143}) é o que mais tende a formar ligações de hidrogênio com os ligantes, constituindo um sítio particularmente atrativo para formação de interações desta natureza (WADANAMBI; JAYATHILAKA; SENEVIRATNE, 2023).

O estudo que consta na página do PDB que deu origem a estrutura cristalográfica da M^{pro} de código PDB:7k0e avaliou a efetividade antiviral de derivados deuterados da molécula GC376, um inibidor da $3CL^{pro}/M^{pro}$. Esta pesquisa descreveu que as interações mais relevantes para o reconhecimento molecular da GC376 e/ou seus derivados deuterados foram as ligações de hidrogênio com os resíduos de

fenilalanina 140 (Phe^{140}), histidina 163 (His^{163}), histidina 164 (His^{164}), ácido glutâmico 166 (Glu^{166}) e Glutamina 189 (Gln^{189}), além da ligação covalente com o resíduo de cisteína 145 (Cys^{145}) (DAMPALLA et al., 2021).

Adicionalmente, o enantiômero *R* do composto 2 fez ligação de hidrogênio com o resíduo de histidina 41 (His^{41}), e o enantiômero *S* estabeleceu uma ligação de hidrogênio com o resíduo de serina 144 (Ser^{144}), ambos utilizando grupamentos funcionais hidroxila (DAMPALLA et al., 2021).

A outra estrutura cristalográfica utilizada neste estudo, isto é, a PDB:7tll, que consiste em uma variação da M^{pro} decorrente das mutações genéticas da variante ômicron, investigou a base estrutural para justificar a eficácia *in vitro* do nirmatrelvir frente a variantes de preocupação do SARS-CoV-2 (VOC, ou *Variants of Concern*, do inglês). Este estudo verificou que não houve variação significativa da eficácia de inibição da replicação em função das alterações genéticas das variantes. De acordo com a caracterização estrutural do sítio ativo da M^{pro}, este é composto pelos aminoácidos-chave: glutamina 189 (Gln^{189}), histidina 41 (His^{41}), histidina 164 (His^{164}), cisteína 145 (Cys^{145}), histidina 163 (His^{163}), tirosina 140 (Tyr^{140}) e ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}).

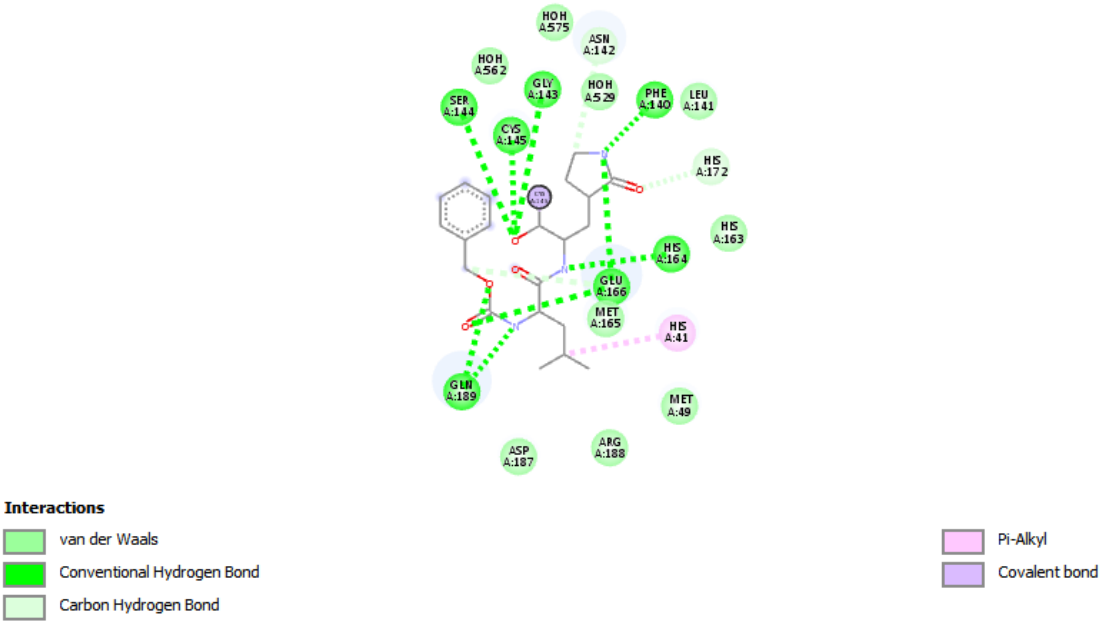
Um estudo recente investigou a capacidade inibitória de compostos heterocíclicos inovadores derivados de pirazolo-piridiminonas utilizando a estrutura cristalográfica de código PDB:7tll. Os compostos intitulados 7, 8 e 13 mostraram perfis de interação e valores de energia de ligação (-8.0, -8.2 e -7.8 kcal mol^{-1}, respectivamente) interessantes se comparados com aqueles do nirmatrelvir (-7.7 kcal mol^{-1} no *docking* deste estudo) mostrando interações de hidrogênio com os aminoácidos asparagina 142 (Asn^{142}), cisteína 145 (Cys^{145}), glutamato 166 (Glu^{166}), glicina 143 (Gly^{143}) e treonina 26 (Thr^{26}), assim como interações π+π, π-alquila e alquila-alquila com outros resíduos de aminoácidos importantes do sítio ativo (HORCHANI et al., 2022).

Considerando as informações encontradas com o levantamento bibliográfico, foi feita a análise dos resultados dos procedimentos de *docking* conduzidos neste estudo. Levou-se em consideração o perfil de interações não covalentes (intermoleculares), energias livres de ligação e constantes de inibição estimadas.

2.3.2 DOCKING DO COMPLEXO GERADO A PARTIR DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7K0E COM O AUTODOCK 4.2.6 – 100 CORRIDAS INDEPENDENTES

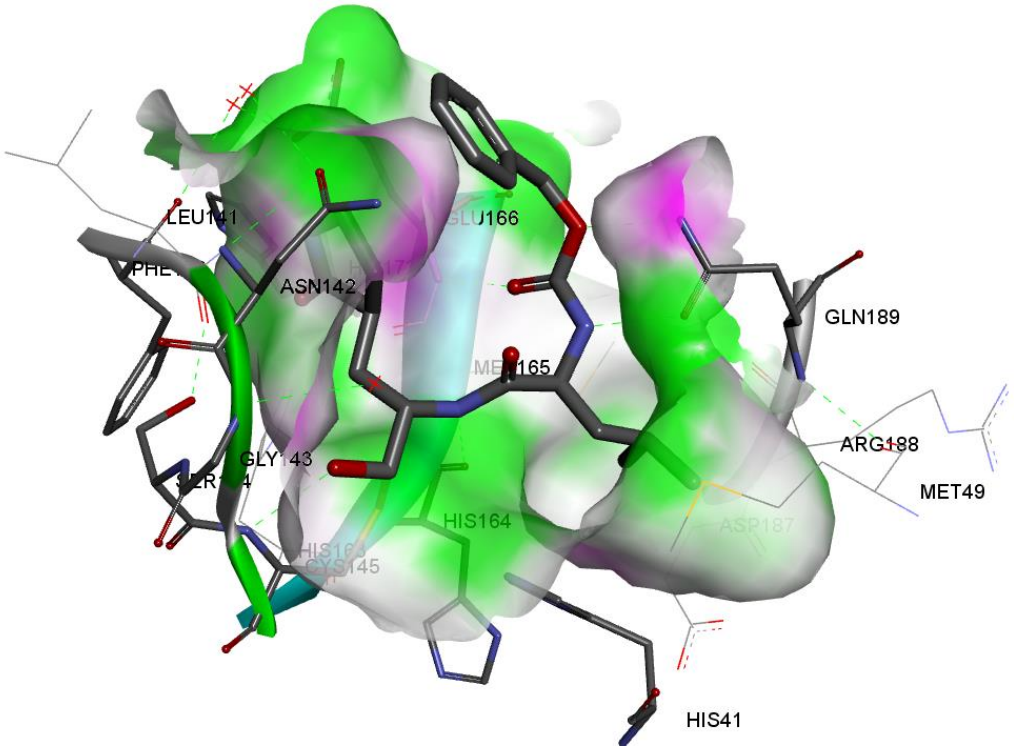
As interações do ligante GC376 no sítio ativo da $3CL^{pro}/M^{pro}$ podem ser observadas no diagrama 2D gerado a partir da estrutura cristalográfica PDB:7k0e no formato .pdb com o programa *Discovery Studio Visualizer* (figura 11). A superfície de ligação de hidrogênio é mostrada na figura 12, onde as regiões em verde, ricas em densidade eletrônica, representam os sítios aceptores de ligação de hidrogênio, enquanto as regiões em rosa, deficientes em densidade eletrônica, representam os sítios doadores de ligação de hidrogênio.

Figura 11: Diagrama 2D mostrando o perfil de interações ligante-receptor do inibidor GC376 no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: Adaptado pelo Autor (DAMPALLA et al., 2021).

Figura 12: Superfície de ligação de hidrogênio do ligante GC376 no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)

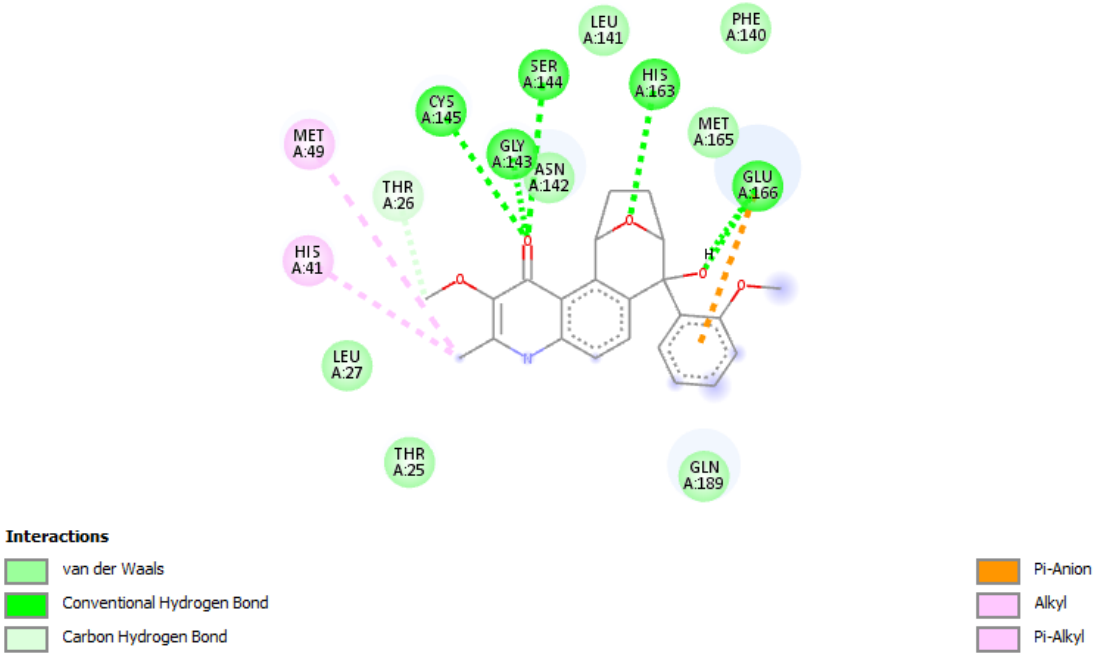


Fonte: Adaptado pelo Autor (DAMPALLA et al., 2021)

Desta forma, tendo em vista os resultados dos *dockings* conduzidos neste estudo, foi feita a comparação dos perfis de interação do ligante complexado com os controles e as waltherionas ciclizadas, de modo a identificar se os pontos-chave de interação ligante-receptor foram estabelecidos com os candidatos a fármaco testados. Ademais, foi feita a correlação dessas informações com os valores de energia e constantes de inibição de cada ligante. Contudo, vale ressaltar novamente que, com a metodologia de *docking* empregada, não foi possível verificar a potencial formação da ligação covalente com o resíduo de cisteína 145 (Cys^{145}) por adição conjugada.

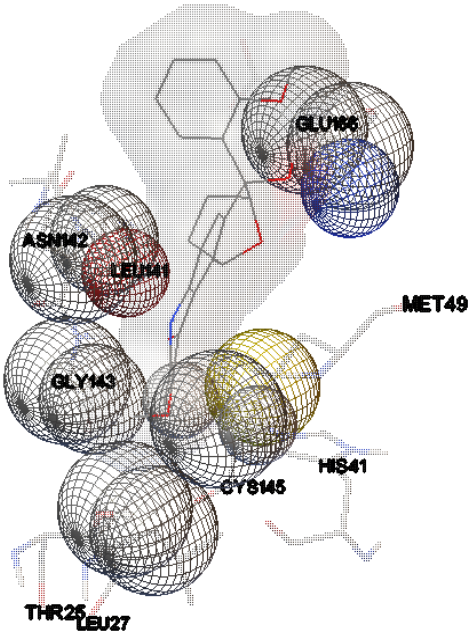
A waltheriona A estabeleceu ligações de hidrogênio com os resíduos de cisteína 145 (Cys^{145}), glicina 143 (Gly^{143}), serina 144 (Ser^{144}), histidina 163 (His^{163}) e ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}) (Figuras 11, 12 e 13); interação do tipo complexo π-cadeia alquila com o resíduo de histidina 41 (His^{41}); interação do tipo alquila-alquila com o resíduo de aminoácido metionina 49 (Met^{49}); interação carbono-hidrogênio com o resíduo de treonina 26 (Thr^{26}); e interações de van der Waals com fenilalanina 140 (Phe^{140}), leucina 141 (Leu^{141}), metionina 165 (Met^{165}), leucina 27 (leu^{27}), treonina 25 (Thr^{25}), glutamina 189 (Gln^{189}) e asparagina 142 (Asn^{142}) (Figura 11).

Figura 13: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da M^{pro} (código:PDB:7k0e)



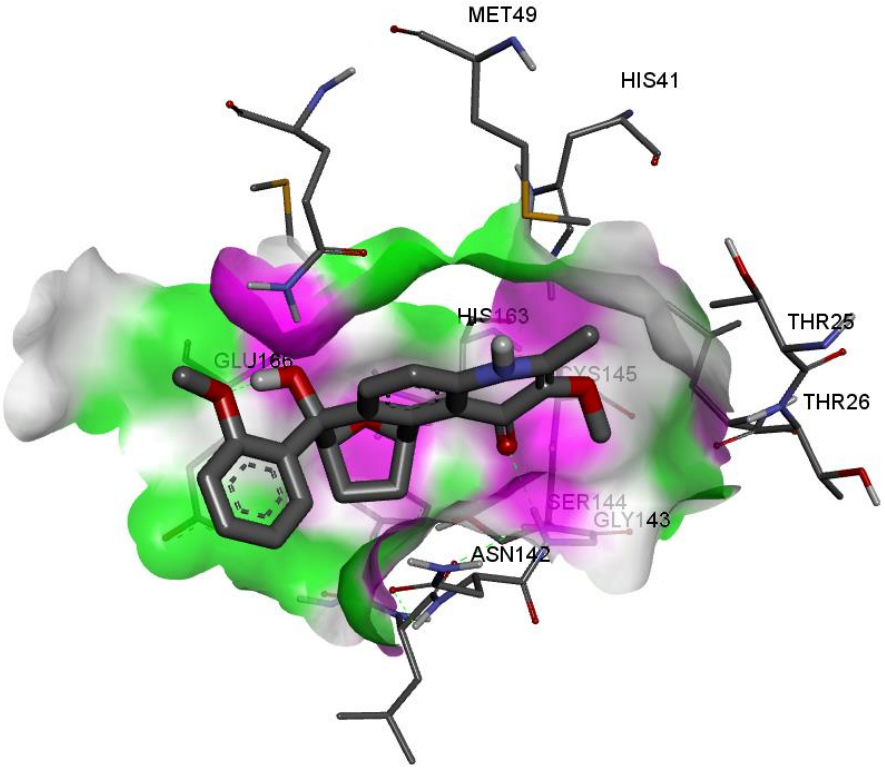
Fonte: O Autor (gerado com *Studio Visualizer*).

Figura 14: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

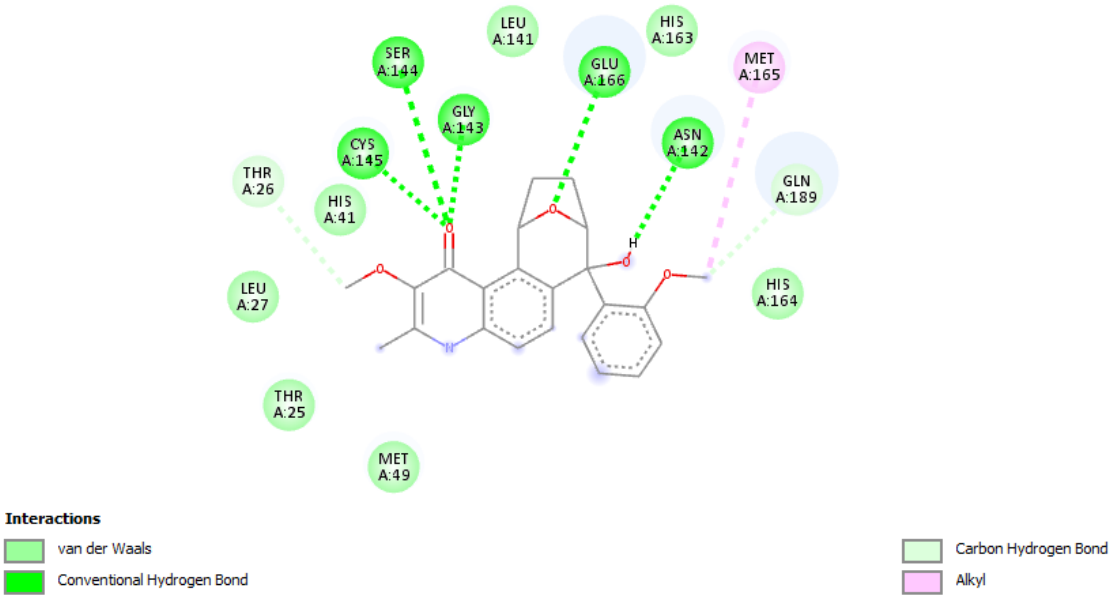
Figura 15: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona A com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

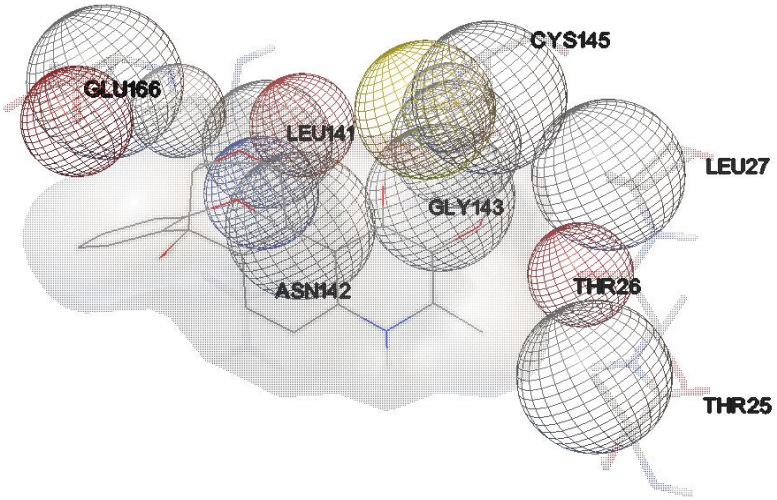
A waltheriona B formou ligações de hidrogênio com os resíduos de serina 144 (Ser^{144}), cisteína (Cys^{145}), glicina (Gly^{143}), ácido glutâmico/glutamato (Glu^{166}) e asparagina 142 (Asn^{142}); interação carbono-hidrogênio com a treonina 26 (Thr^{26}) e glutamina 189 (Gln^{189}) (Figuras 14, 15 e 16); e interações de van der Waals com a histidina 41 (His^{41}), leucina 141 (Leu^{141}), histidina 163 (His^{163}), leucina 27 (Leu^{27}), treonina 25 (Thr^{25}), metionina 49 (Met^{49}) e histidina 164 (His^{164}) (Figura 14).

Figura 16: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



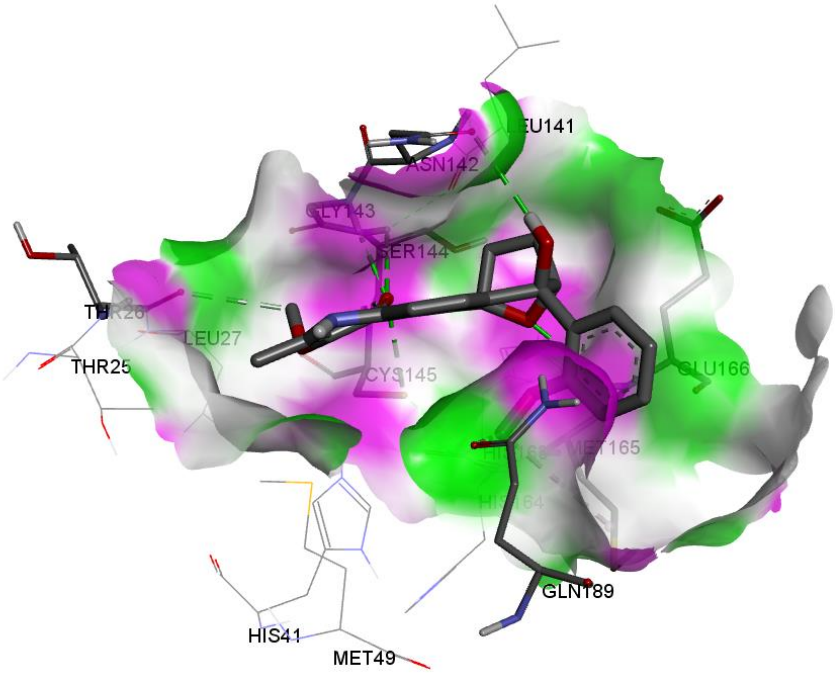
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Figura 17: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

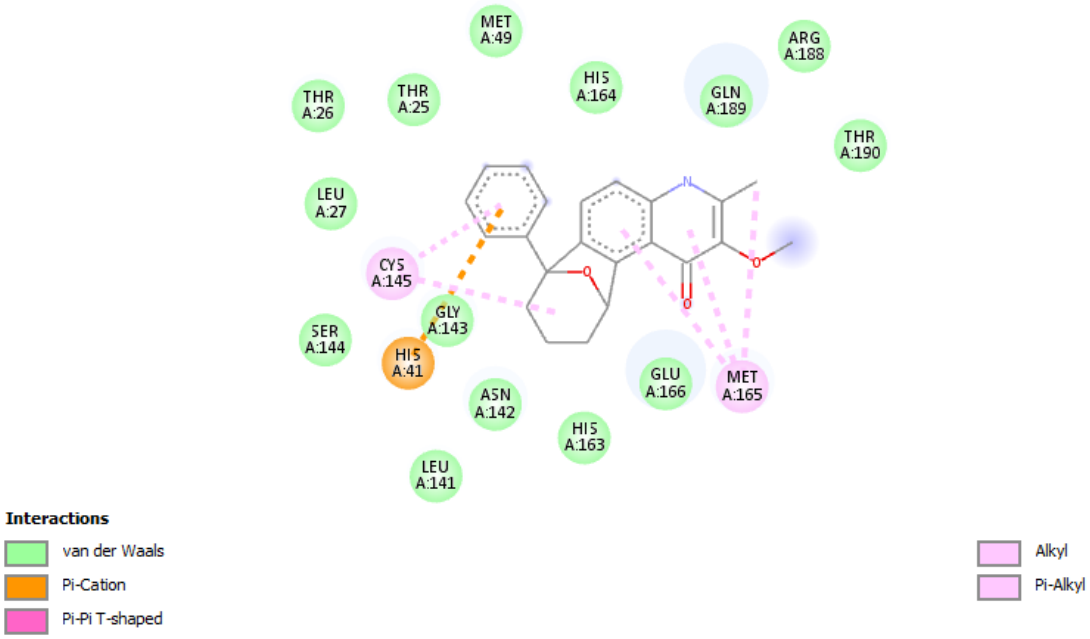
Figura 18: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona B com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

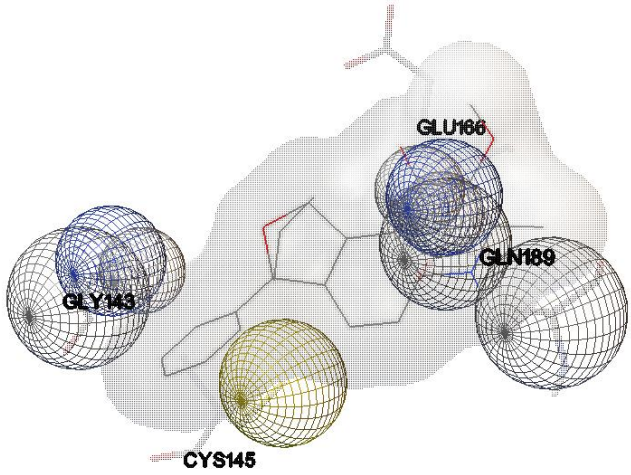
A waltheriona C formou interação π-cátion e π+π com o resíduo de histidina 41 (His^{41}); π-alquila e alquila-alquila com os resíduos de cisteína 145 (Cys^{145}) e metionina 165 (Met^{165}); van der Waals com os resíduos de treonina 190 (Thr^{190}), Arginina 188 (Arg^{188}), glutamina 189 (Gln^{189}), histidina 164 (His^{164}), metionina (Met^{49}), treonina 25 (Thr^{25}), treonina 26 (Thr^{26}), leucina 27 (Leu^{27}), serina 144 (Ser^{144}), glicina 143 (Gly^{143}), asparagina 142 (Asn^{142}), leucina 141 (Leu^{141}), histidina 163 (His^{163}) e ácido glutâmico 166 (Glu^{166}) (Figuras 17, 18 e 19).

Figura 19: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



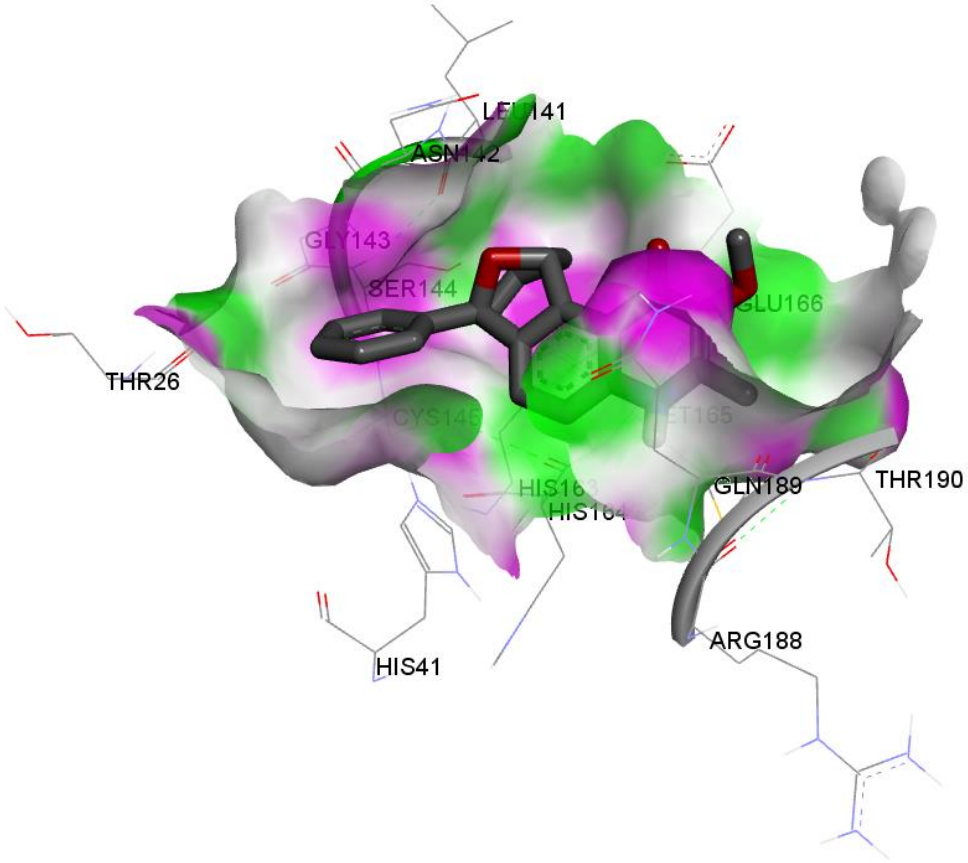
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Figura 20: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

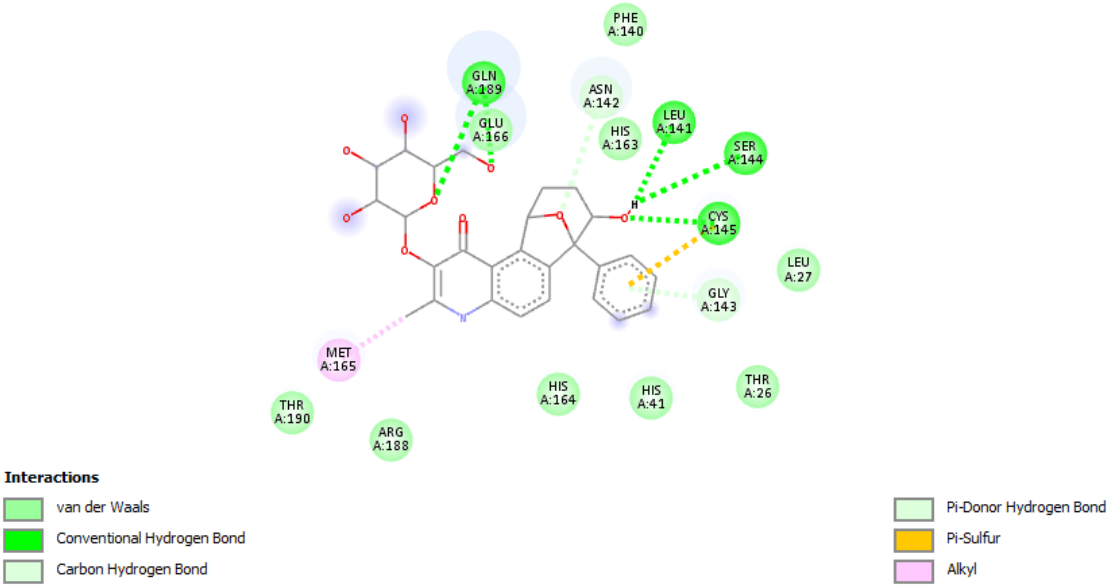
Figura 21: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona C com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

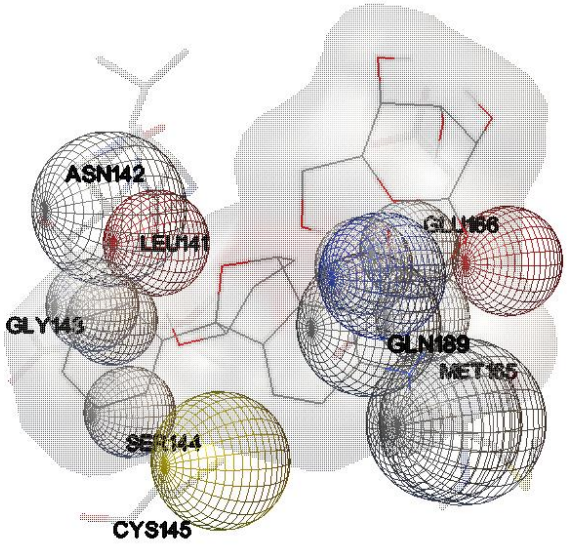
A waltheriona D fez ligação de hidrogênio com os resíduos de cisteína 145 (Cys^{145}), serina 144 (Ser^{144}), leucina 141 (Leu^{141}) e glutamina 189 (Gln^{189}); π-enxofre com o resíduo de cisteína 145 (Cys^{145}) (Figuras 20, 21 e 22); alquila-alquila com a metionina 165 (Met^{165}); ligação de hidrogênio com doador π com a glicina 143 (Gly^{143}); e interação carbono-hidrogênio com o aminoácido asparagina 142 (Asn^{142}) (Figura 20).

Figura 22: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



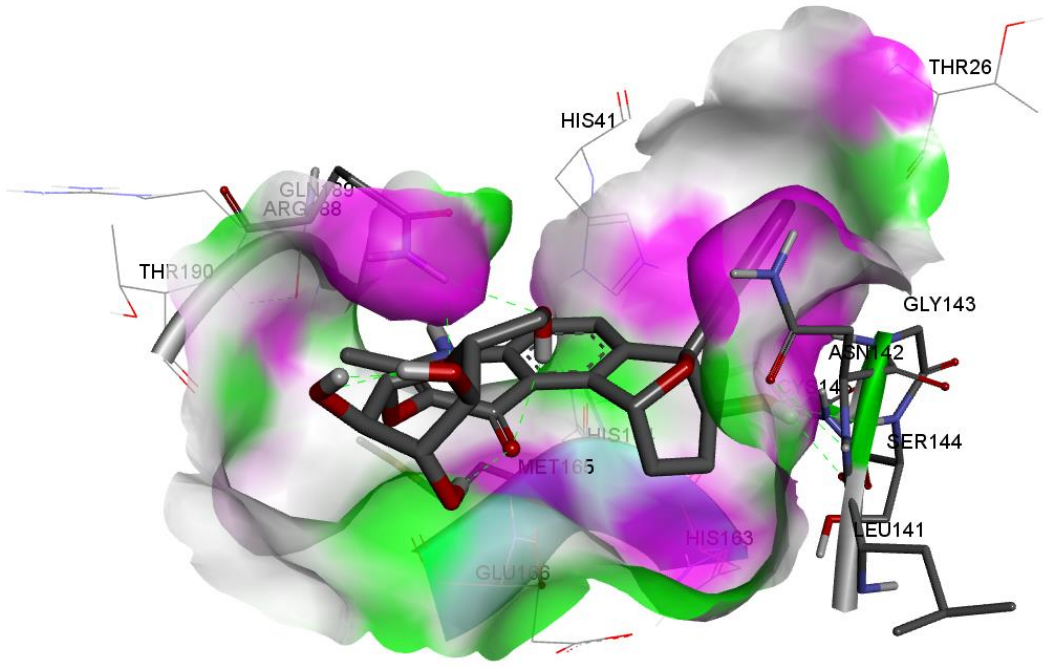
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Figura 23: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

Figura 24: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona D com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7k0e)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Portanto, todas as waltherionas formaram interações não covalentes com resíduos de aminoácido importantes para o processo de inibição reversível da M^{pro}, incluindo a díade catalítica cisteína 145 (Cys^{145}) e histidina 41 (His^{41}) – exceto pela waltheriona D, que fez interação apenas com o resíduo Cys^{145}, mas não com o His^{41}.

As waltherionas A e B formaram ligações de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Glu^{166}, essencial para formação do homodímero funcional, como mencionado previamente. A waltheriona C fez uma interação de van der Waals com este aminoácido. As waltherionas A e B formaram ligações de hidrogênio com os resíduos Ser^{144} e Gly^{143}, interações tipicamente encontradas na bibliografia levantada e ressaltadas como relevantes para a inibição não covalente – particularmente a Gly^{143}, que na maioria dos casos forma interação de hidrogênio.

Levando em consideração as interações com os controles, particularmente o ligante complexado com a estrutura cristalográfica, K36 (GC376), também foi possível observar um perfil semelhante de interação ligante-receptor para as waltherionas. Todas as interações-chave descritas na revisão de literatura encontradas para o ligante complexado e os controles foram encontradas nos diagramas gerados para as waltherionas A, B, C e D, especialmente as duas primeiras, que formaram ligações de hidrogênio (as interações mais energeticamente favoráveis para o complexo ligante-

receptor) com os resíduos de aminoácido considerados essenciais para interação que leva à clivagem proteolítica das poliproteínas pp1a e pp1b.

Os demais controles formaram as interações esperadas, incluindo as ligações de hidrogênio com os resíduos Glu^{166}, Gly^{143} e Gln^{189}, além de outras interações com His^{41}, Cys^{145}, Thr^{190} e His^{164}. Ou seja, foi estabelecido um perfil de interações intermoleculares favorável para o bloqueio do sítio catalítico com as moléculas testadas.

Os valores de energia livre de ligação e as constantes de inibição dos complexos refletem as tendências encontradas por meio da análise do perfil de interações intermoleculares. As waltherionas apresentaram valores de energia mais negativos e menores valores de constante de inibição do que aqueles observados para os controles, incluindo o ligante complexado, K36.

Estes parâmetros têm apenas valor comparativo entre resultados alcançados com uma mesma metodologia e nas mesmas condições, de modo que a comparação com valores da literatura não é de grande valia, visto que os parâmetros de cálculo variam em função do algoritmo de *docking* utilizado, quantidade de dockings independentes conduzidos, *clusters* gerados e programa empregado para rodar o procedimento de *docking*. Estes valores foram úteis apenas para analisar e comparar os perfis de interação ligante-receptor obtidos com a metodologia utilizada neste estudo.

Tabela 11 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição das waltherionas ciclizadas com a M^{pro} (código PDB:7k0e)

Ligante do Complexo	**Energia Livre do Complexo (kcal mol^{-1})**	**Constante de Inibição (μM)**	**Aminoácidos que fazem Interações Importantes no Sítio Ativo**
waltheriona A	-5.91	46.68	Ligação de hidrogênio: Cys145, Gly143, Ser144, His163, Glu166; π-ânion: Glu166; π-alquil: His41; alquil-alquil: Met49; van der Waals: Phe140, Leu141, Met165, Leu27, Thr25, Gln189 e Asn142; interação carbono-hidrogênio: Thr26.
waltheriona B	-5.96	42.52	Ligação de hidrogênio: Ser144, Cys145, Gly143, Glu166 e Asn142; Ligação carbono-hidrogênio: Thr26 e Gln189; van der Waals: His41; Leu141, His163, Leu27, Thr25, Met49 e His164.
waltheriona C	-6.74	11.38	Π-cátion: His41; Π- Π: His41; Π-alquil: Cys145 e Met165; alquil-alquil: Cys145, Met165; van der Waals: Thr190, Arg188, Gln189, His164, Met49, Thr25, Thr26, Leu27, Ser144, Gly143, Asn142, Leu141, His163 e Glu166.
waltheriona D	-6.08	34.70	Ligação de hidrogênio: Cys145, Ser144, Leu141 e Gln189; π-enxofre: Cys145; alquil-alquil: Met165; ligação de hidrogênio com doador π: Gly143; interação carbono-hidrogênio: Asn142.

Fonte: O Autor.

Tabela 12 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição dos controles com a M^{pro} (código PDB:7k0e)

Ligante do Complexo	**Energia Livre do Complexo (kcal mol^{-1})**	**Constante de Inibição (μM)**	**Aminoácidos que fazem Interações Importantes no Sítio Ativo**
K36	-5.83	52.90	Ligação de hidrogênio: Glu166, Cys145, Leu141, Ser144, Gly143 e Gln189; π-alquil: Pro168 e Ala191; alquil-alquil: Met165; interação carbono-hidrogênio: Glu166; van der Waals: Asp187, Arg188, Thr190, Gln192, Leu167, His164, His41, His163 e Phe140.
atazanavir	-3.22	4340	Ligação de hidrogênio: Glu166 e Gln189; empilhamento π-π: His41; π-enxofre: Met49; π-alquil: Met165; alquil-alquil: Met165 e Pro168; van der Waals: Thr190, Ala191, Leu167, Gly170, His164, Asn142, Arg188, Asp187 e Tyr54.
darunavir	-5.44	103.58	Ligação de hidrogênio: Glu166, Gly143 e Gln189; π-alquil: His41 e Met165; alquil-alquil: Cys145; interação de hidrogênio com doador π: Gln189; interação carbono-hidrogênio: Glu166; van der Waals: Asn142, Arg188, Asp187, Thr190, Ala191, Pro168, Leu167, Met49 e His164.
favipiravir	-3.57	2410	Ligação de hidrogênio: Glu166 e His164; empilhamento π em T: His 41; π-alquil: Met165; ligação de halogênio (com átomo de flúor): Asp187 e Arg188; interação carbono-hidrogênio: Gln189; van der Waals: Cys145, Leu167 e Thr190.

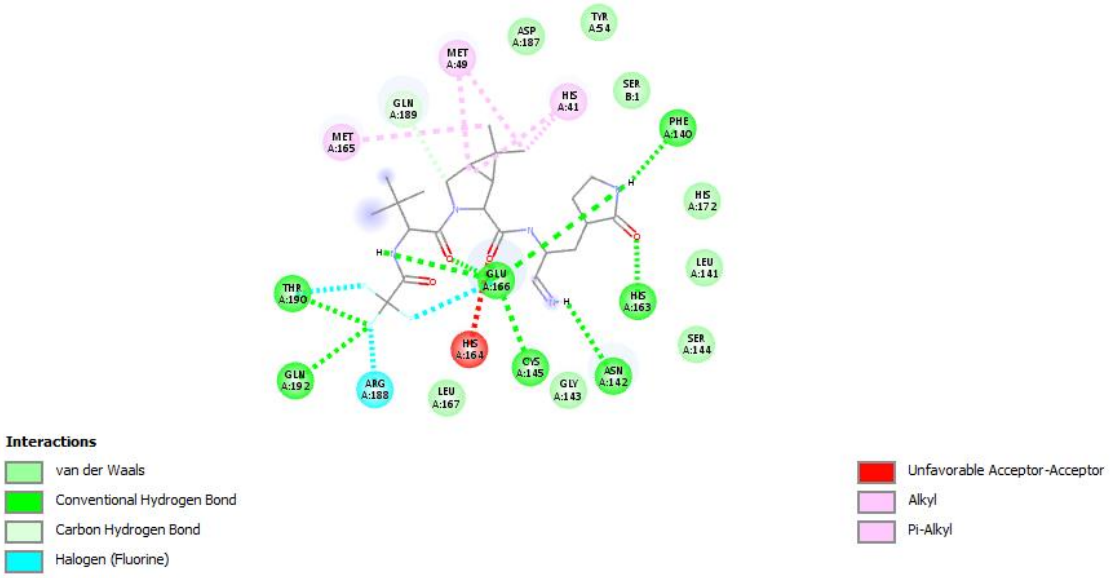
remdesivir	-4.58	442.81	Ligação de hidrogênio: Gln189, Gly143, Cys145, Leu141 e His163; iônica: Glu166; π-alquil: Cys145; alquil-alquil: Pro168; interação carbono-hidrogênio: Leu141, Asn142 e Glu166; van der Waals: Phe140, His172, Gly170, Leu167, Met165, Arg188, Met49, His164 e His41; doador-doador (desfavorável): Ser144.

Fonte: O Autor.

2.3.2 DOCKING DO COMPLEXO GERADO A PARTIR DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE CÓDIGO PDB:7TLL COM O AUTODOCK 4.2.6 – 100 CORRIDAS INDEPENDENTES

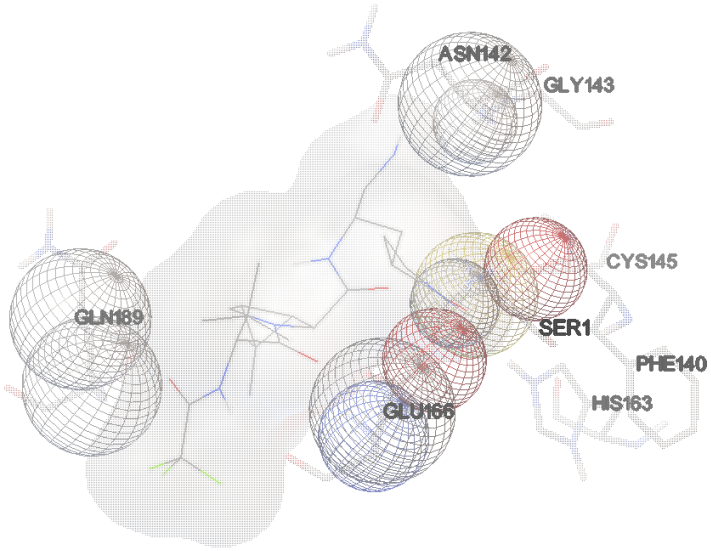
O nirmatrelvir, inibidor complexado na estrutura cristalográfica de código PDB:7tll, formou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácido ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}), fenilalanina 140 (Phe^{140}), histidina 163 (His^{163}), asparagina 142 (Asn^{142}), cisteína 145 (Cys^{145}), glutamina 192 (Gln^{192}) e treonina 190 (Thr^{190}) (Figuras 23 e 25); ligação de halogênio envolvendo a interação dos átomos de flúor do ligante com os aminoácidos treonina 190 (Thr^{190}), glutamina 192 (Gln^{192}), ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}) e arginina 188 (Arg^{188}); π+alquila com a histidina 41 (His^{41}); alquila-alquila com as metioninas 49 e 165 (Met^{49} e Met^{165}); interação carbono-hidrogênio com a glutamina 189 (Gln^{189}); e *van der Waals* com a tirosina 54 (Tyr^{54}), ácido aspártico/aspartato 187 (Asp^{187}), alanina 191 (Ala^{191}), prolina 168 (Pro^{168}), leucina 167 (Leu^{167}), glicina 143 (Gly^{143}), serina 144 (Ser^{144}), leucina 141 (Leu^{141}) e histidina 172 (His^{172}); aceptor-aceptor, energeticamente desfavorável para a estabilidade do complexo, com a histidina 164 (His^{164}) (Figuras 23, 24 e 25).

Figura 25: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor do nirmatrelvir no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



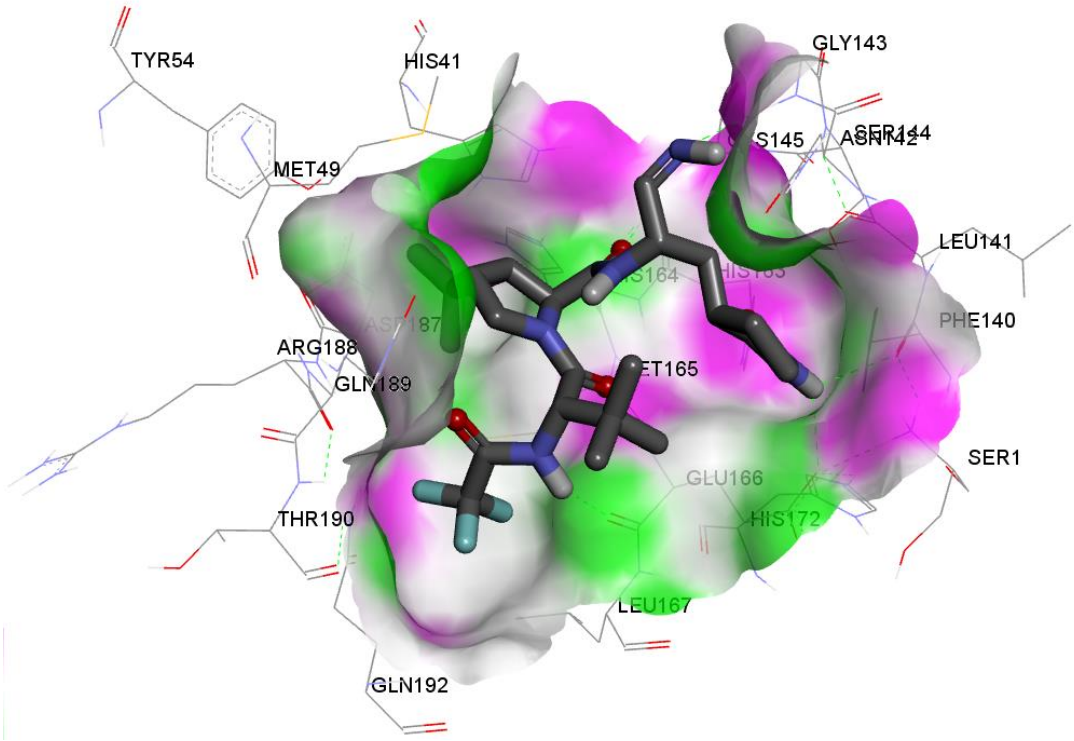
Fonte: O Autor.

Figura 26: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor do nirmatrelvir no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor.

Figura 27: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação do nirmatrelvir com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)

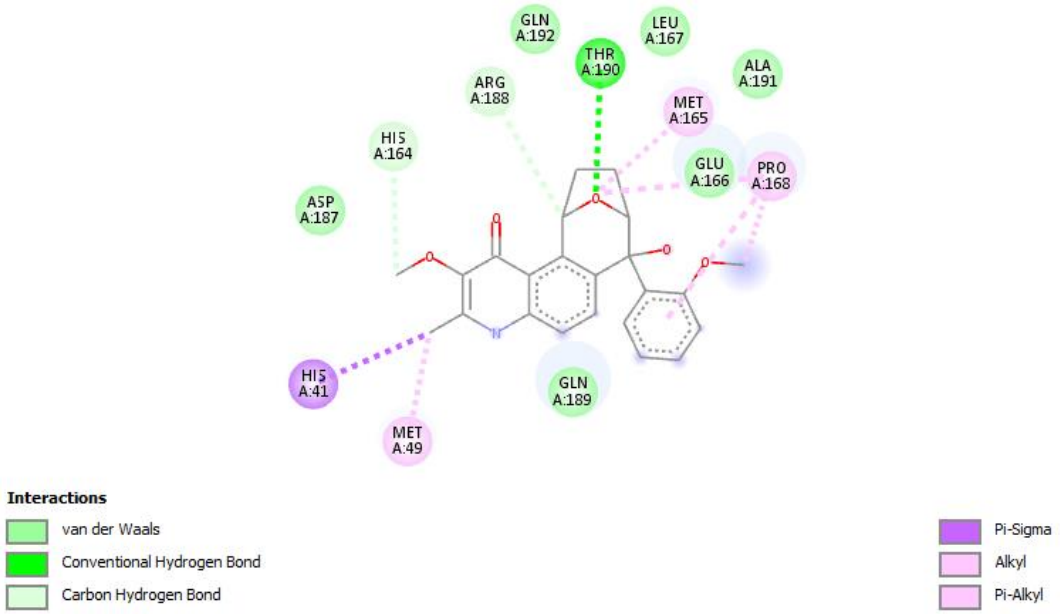


Fonte: O Autor.

A waltheriona A formou ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido de treonina 190 (Thr^{190}); interação do tipo π+σ com a histidina 41 (His^{41}); π-alquila com

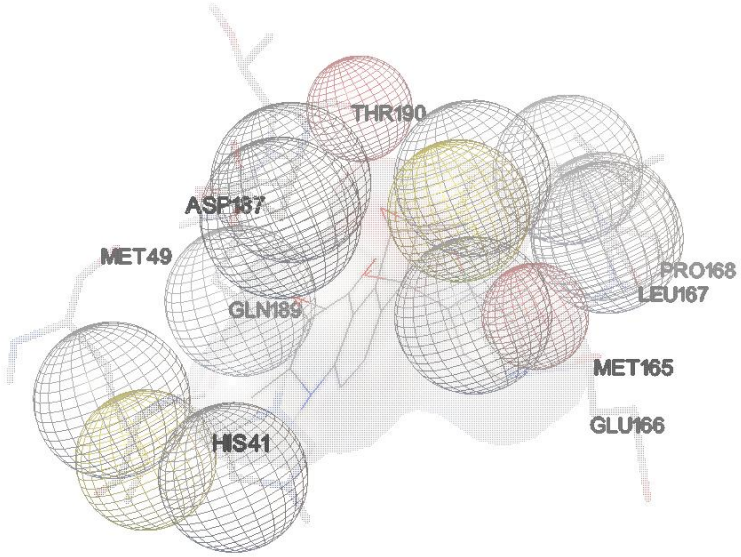
a prolina 168 (Pro^{168}); alquila-alquila com a metionina 49 (Met^{49}), metionina 165 (Met^{165}) e prolina 168 (Pro^{168}); interação carbono-hidrogênio: arginina 188 (Arg^{188}), histidina 164 (His^{164}) e ácido glutâmico 166 (Glu^{166}); interação de *van der Waals*: asparagina 187 (Asp^{187}), glutamina (Gln^{192}), leucina 167 (Leu^{167}), alanina 191 (Ala^{191}) e glutamina 189 (Gln^{189}) (Figuras 26, 27 e 28).

Figura 28: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



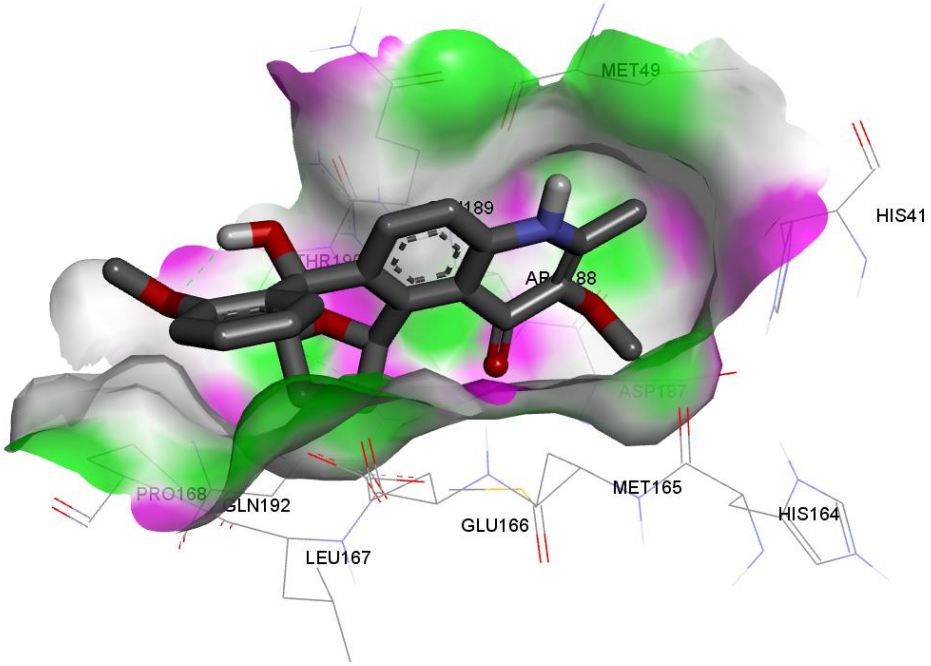
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer)*.

Figura 29: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona A no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

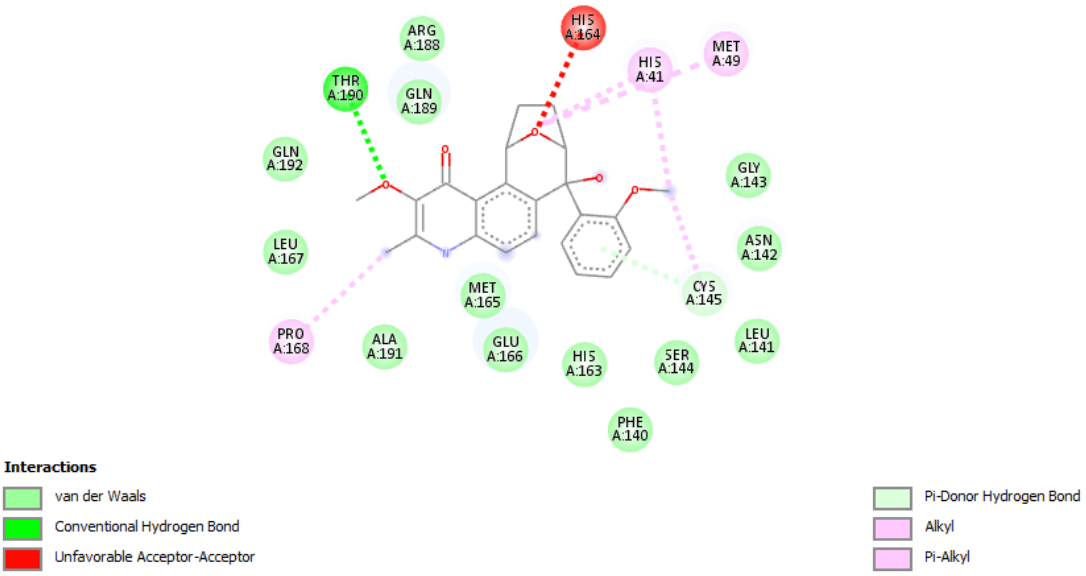
Figura 30: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona A com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

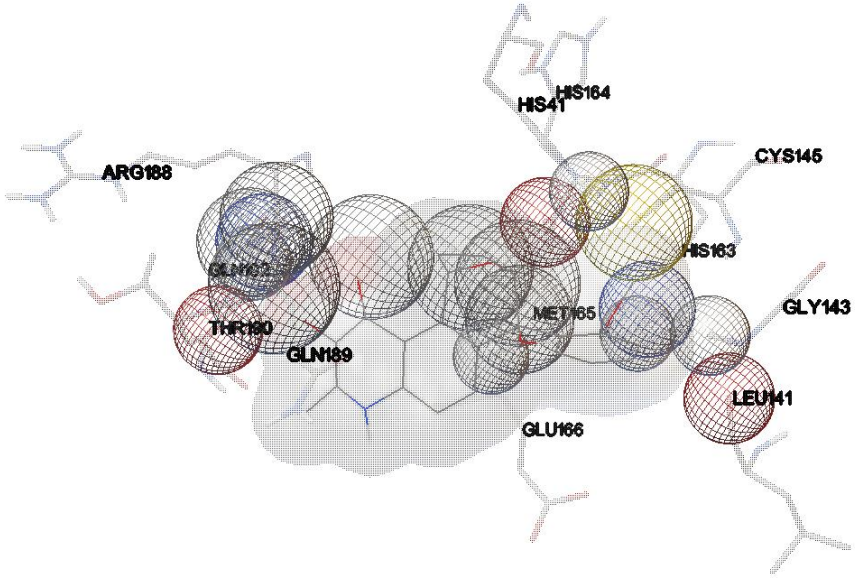
A waltheriona B formou ligação de hidrogênio com o resíduo de treonina 190 (Thr^{190}); π-alquila com a histidina 41 (His^{41}); alquila-alquila com a cisteína 145 (Cys^{145}), metionina 49 (Met^{49}) e prolina 168 (Pro^{168}); aceptor-aceptor, energeticamente desfavorável para o complexo, com a histidina 164 (His^{164}); *van der Waals* com a arginina 188 (Arg^{188}), glutamina 189 (Gln^{189}), glutamina 192 (Gln^{192}), leucina 167 (Leu^{167}), alanina 191 (Ala^{191}), metionina 165 (Met^{165}), ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}), histidina 163 (His^{163}), fenilalanina 140 (Phe^{140}), serina 144 (Ser^{144}), leucina 141 (Leu^{141}), glicina 143 (Gly^{143}) e asparagina (Asn^{142}) (Figuras 29, 30 e 31).

Figura 31: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



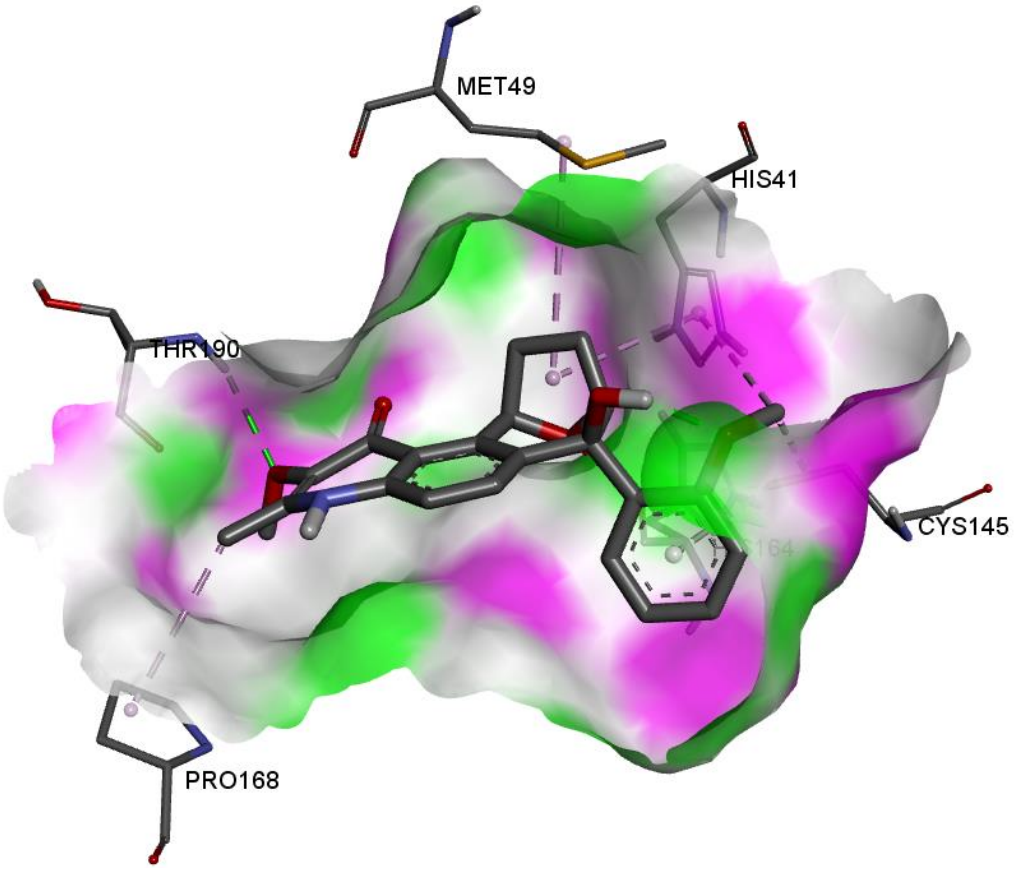
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Figura 32: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona B no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

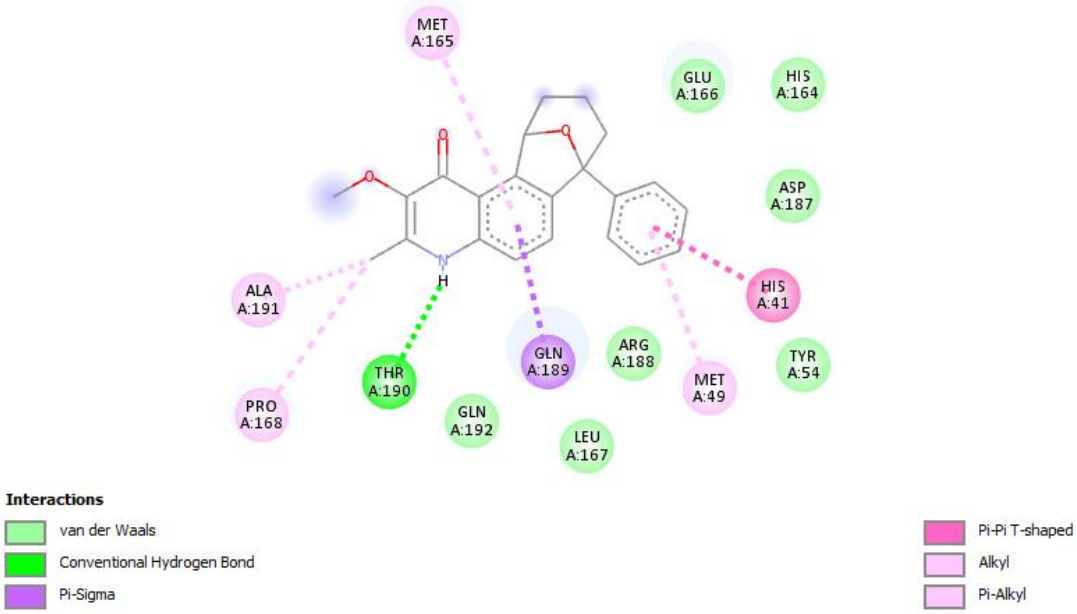
Figura 33: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona B com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o Discovery Studio Visualizer).

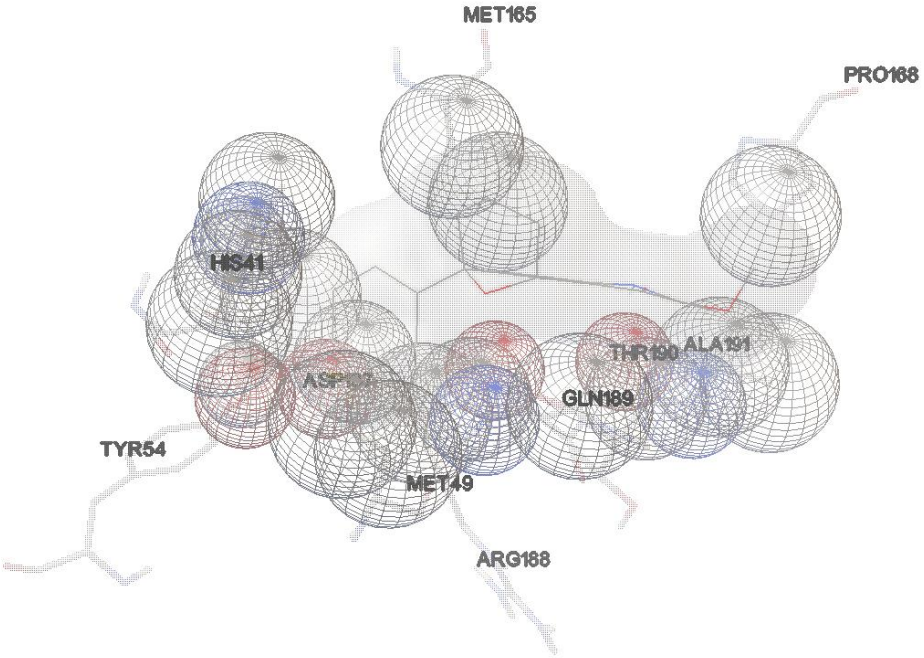
A waltheriona C fez ligação de hidrogênio com a treonina 190 (Thr^{190}); interação do tipo π+σ com a glutamina 189 (Gln^{189}); empilhamento π+π em T com a histidina 41 (His^{41}); π+alquila com a metionina 49 (Met^{49}) e metionina 165 (Met^{165}); alquila-alquila com a alanina 191 (Ala^{191}) e prolina 168 (Pro^{168}); *van der Waals* com os aminoácidos ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}), histidina 164 (His^{164}), ácido aspártico/aspartato 187 (Asp^{187}), tirosina 54 (Tyr^{54}), arginina 188 (Arg^{188}), leucina 167 (Leu^{167}) e glutamina 192 (Gln^{192}) (Figuras 32, 33 e 34).

Figura 34: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



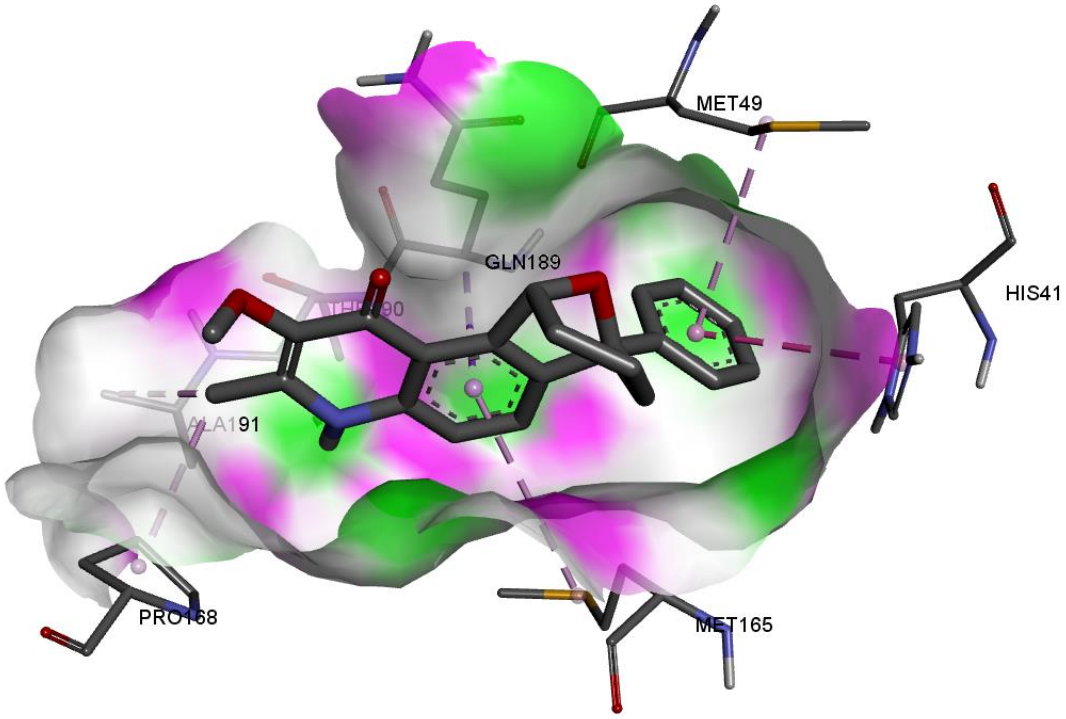
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Figura 35: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona C no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

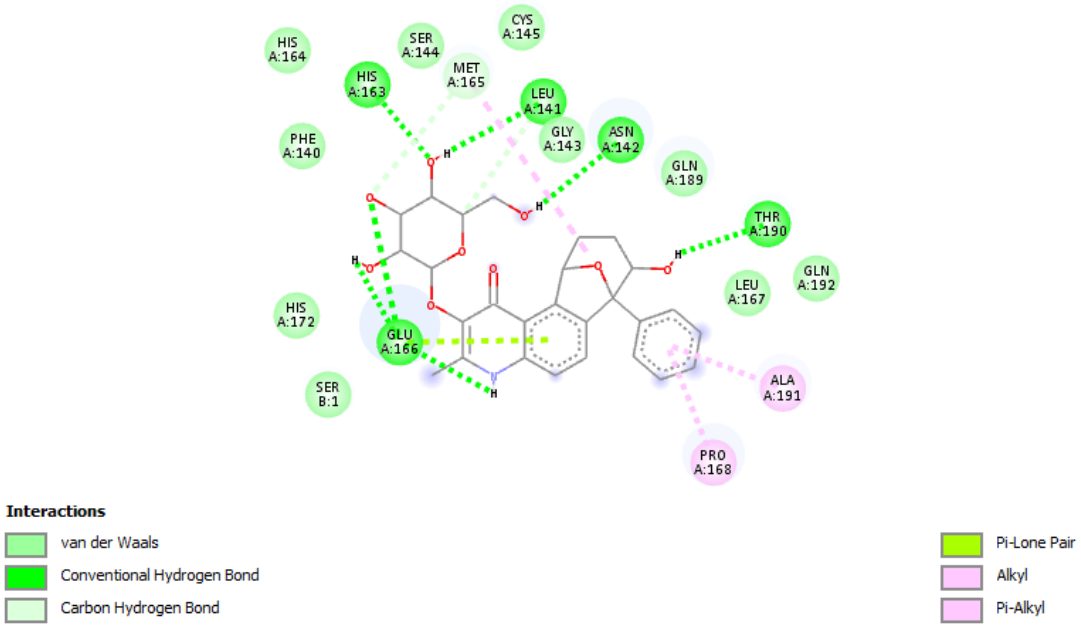
Figura 36: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona C com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

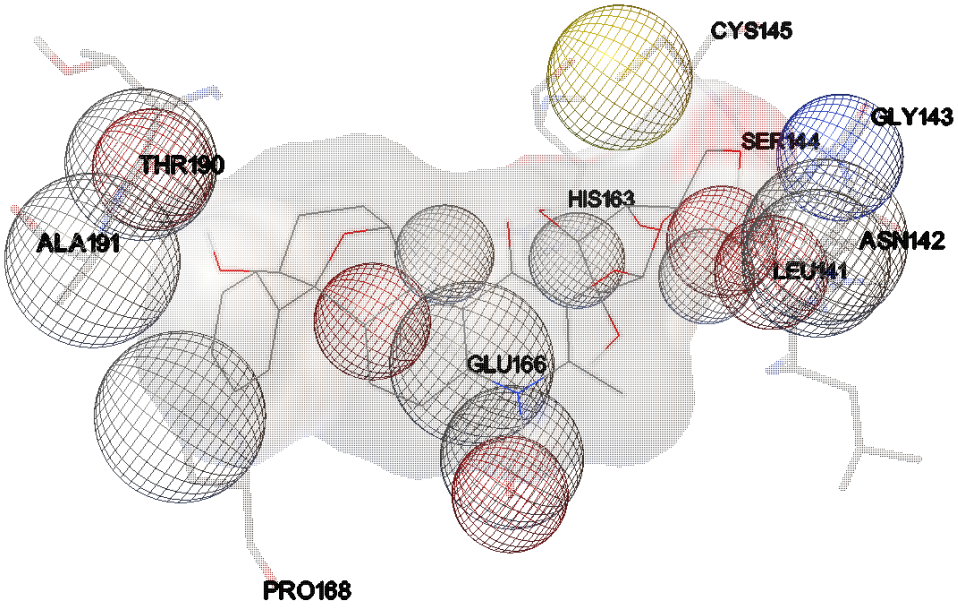
A waltheriona D formou ligações de hidrogênio com os aminoácidos treonina 190 (Thr^{190}), ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}), histidina 163 (His^{163}), leucina 141 (Leu^{141}), asparagina 142 (Asn^{142}); complexo π + par não ligante com o ácido glutâmico/glutamato 166 (Glu^{166}); π+alquila com alanina 191 (Ala^{191}) e prolina 168 (Pro^{168}); alquila-alquila com a metionina 165 (Met^{165}); e *van der Waals* com os aminoácidos cisteína 145 (Cys^{145}), serina 144 (Ser^{144}), histidina 164 (His^{164}), fenilalanina 140 (Phe^{140}), histidina 172 (His^{172}), leucina 167 (Leu^{167}) e glutamina 192 (Gln^{192}) (Figuras 35, 36 e 37).

Figura 37: Diagrama 2D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



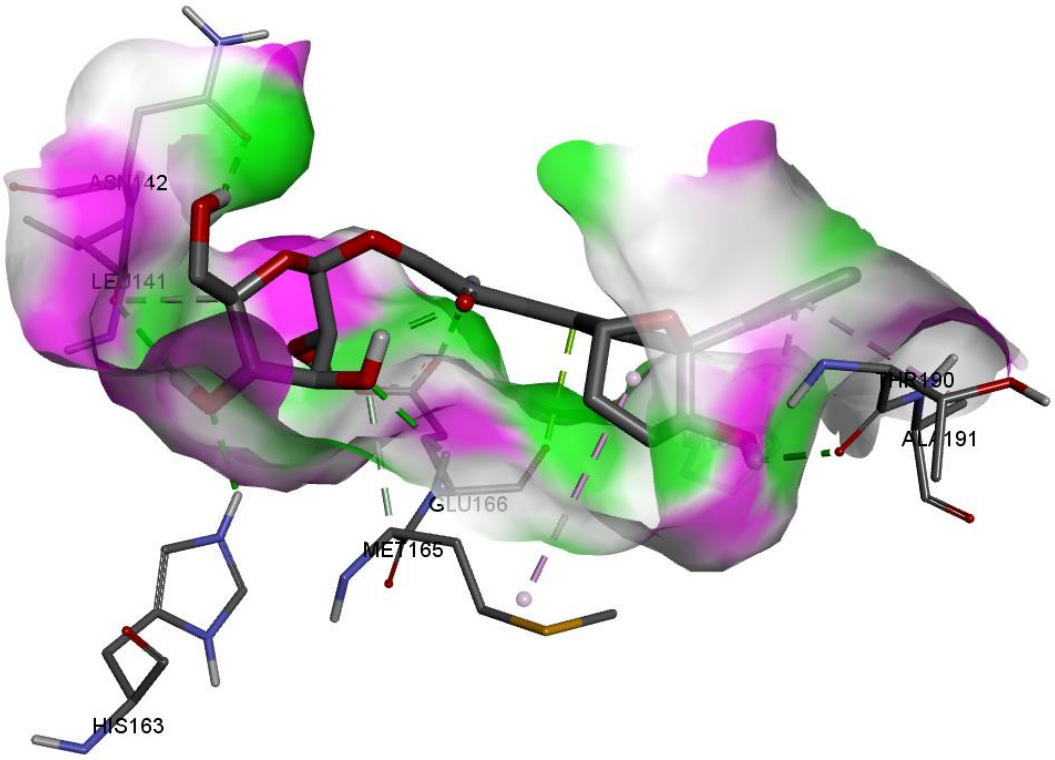
Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Figura 38: Diagrama 3D mostrando as interações ligante-receptor da waltheriona D no sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *AutoDockTools*).

Figura 39: Diagrama 3D mostrando a superfície de ligação de hidrogênio resultante da interação da waltheriona D com o sítio ativo da M^{pro} (código: PDB:7tll)



Fonte: O Autor (gerado com o *Discovery Studio Visualizer*).

Logo, todas as waltherionas ciclizadas formaram ligação de hidrogênio com o resíduo Thr^{190}. Adicionalmente, a waltheriona D fez interações de hidrogênio com os resíduos Glu^{166}, His^{163}, Leu^{141} e Asn^{142}.

As waltherionas A, B e C interagiram com o resíduo His^{41}, um dos aminoácidos da díade catalítica. As waltherionas B e D interagiram com o resíduo Cys^{145}, o outro aminoácido da díade catalítica.

Foram encontradas interações de *van der Waals* com o Gln^{189} nos diagramas das waltherionas A e B, e uma interação π-σ com a waltheriona C. Todas as waltherionas formaram interações intermoleculares com os resíduos His^{163} e/ou His^{164}, que também foram identificados como sítios importantes na caracterização estrutural publicada no PDB.

Os outros controles, além do nirmatrelvir complexado na estrutura cristalográfica, também formaram interações não covalentes com alguns dos resíduos descritos na caracterização estrutural do artigo que deu origem a esta estrutura cristalográfica, sendo estes: Cys^{145}, His^{41}, Glu^{166}, Thr^{190}, Gln^{189}, His^{163}, His^{164}. Considerando a relevância da díade catalítica (Cys^{145} e His^{41}) e dos aminoácidos Glu^{166}, Thr^{190} e Gln^{189} para a interação ligante-receptor, os resultados encontrados

sugerem que as moléculas testadas apresentam potencial de interação com o sítio ativo da M^{pro}.

Utilizando os valores de energia livre de ligação e as constantes de inibição do complexo para comparação dos resultados entre si, pode-se constatar que as waltherionas tiverem perfis de interação energeticamente favoráveis se comparados com aqueles do nirmatrelvir e dos outros controles. As waltherionas A, B e D tiveram valores de energia um pouco menos negativos do que aquele encontrado para o ligante cristalográfico, nirmatrelvir. A waltheriona C apresentou um valor um pouco mais negativo do que o do nirmatrelvir (-0,20kcal mol^{-1} de diferença). Todas obtiveram valores mais negativos do que os dos outros controles. Estes valores serviram apenas para corroborar com os perfis de interação encontrados.

Tabela 13 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição das waltherionas ciclizadas com a M^{pro} (código PDB:7tll)

Ligante do Complexo	**Energia Livre do Complexo (kcal mol^{-1})**	**Constante de Inibição (μM)**	**Aminoácidos que fazem Interações Importantes no Sítio Ativo**
waltheriona A	-6.53	16.36	Ligação de hidrogênio: Thr190; interação π-σ: His41; π-alquil: Pro168; alquil-alquil: Met49, Met165 e Pro168; interação carbono-hidrogênio: Arg188, His164 e Glu166; van der Waals: Asp187, Gln192, Leu167, Ala191 e Gln189.
waltheriona B	-6.79	10.46	Ligação de hidrogênio: Thr190; π-alquil: His41; alquil-alquil: Cys145, Met49 e Pro168; aceptor-aceptor: His164; van der Waals: Arg188, Gln189, Gln192, Leu167, Ala191, Met165, Glu166, His163, Phe140, Ser144, Leu141, Gly143 e Asn142.
waltheriona C	-7.57	2.83	Ligação de Hidrogênio: Thr190; interação π-σ: Gln189; empilhamento π-π em T: His 41; π-alquil: Met49 e Met165; alquil-alquil: Ala191 e Pro168; Van der Waals: Glu166, His164, Asp187, Tyr54, Arg188, Leu167 e Gln192.
waltheriona D	-6.85	9.50	Ligação de hidrogênio: Thr190, Glu166, His163, Leu141, Asn142; π-par não ligante: Glu166; π-alquil: Ala191 e Pro168; alquil-alquil: Met165; van der Waals: Cys145, Ser144, His164, Phe140, His172, Leu167 e Gln192.

Fonte: O Autor.

Tabela 14 - Interações intermoleculares ligante-receptor, energias livres de ligação e constantes de inibição dos controles com a M^{pro} (código PDB:7tll)

Ligante do Complexo	**Energia Livre do Complexo (kcal mol^{-1})**	**Constante de Inibição (μM)**	**Aminoácidos que fazem Interações Importantes no Sítio Ativo**
nirmatrelvir	-7.37	3.99	Ligação de hidrogênio: Glu166, Phe140, His163, Asn142, Cys145, Gln192 e Thr190; ligação de halogênio (com átomos de flúor): Thr190, Gln192, Glu166 e Arg188; π-alquil: His41; alquil-alquil: Met49 e Met165; interação carbono-hidrogênio: Gln189; van der Waals: Tyr54, Asp187, Ala191, Pro168, Leu167, Gly143, Ser144, Leu141 e His172; aceptor-aceptor: His164.
atazanavir	-5.07	190.61	Empilhamento sistema π-amida: Arg188; π-cátion: His41; π-enxofre: Met165; π-alquil: Pro168 e Met49; alquil-alquil: Pro168; interação carbono-hidrogênio: Asn142 e Met165; van der Waals: Gln189, Tyr54, Asp187, Gln192, Thr190, Ala191, Leu167, Glu166, Thr25, Gly143 e Ser46.
darunavir	-6.01	39.01	Ligação de hidrogênio: Glu166, Met49 e Thr90; π-alquil: Cys145 e His41; alquil-alquil: Met165; interação carbono-hidrogênio: Gln189; van der Waals: Ser46, His164, Arg188, Asp187, Gln192, Ala191, Pro168, His163, Phe140, Ser144, Leu141, Asn142, Gly143, Thr25 e Leu27.
favipiravir	-3.30	3790	Ligação de hidrogênio: Glu166, Arg188 e Thr190; ligação de halogênio (com átomo de flúor): Asp187 e Arg188; π-alquil: Met165; van der Waals: His164, Gln189, Val186, Gln192, Ala191, Leu167 e Pro168.

remdesivir	-5.73	63.25	Ligação de hidrogênio: Cys145, His41 e Glu166; empilhamento π-π em T: His41; π-alquil: Met165; alquil-alquil: Leu167 e Pro168; interação carbono-hidrogênio: Asn142 e Gln189; van der Waals: Thr190, Gln192, Ala191, Arg188, Asp187, His164, Leu141, Ser144, Leu27, Gly143.

Fonte: O Autor.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com a previsão ADMET sugerem que as waltherionas A, B e C são interessantes do ponto de vista farmacocinético, uma vez que todas apresentam parâmetros de absorção, metabolização/biotransformação, distribuição e eliminação adequados para uma substância destinada à administração por via oral. A waltheriona D foi a única que não apresentou características adequadas para ser um bom candidato a fármaco para administração por via oral. Adicionalmente, os parâmetros toxicológicos também foram desejáveis, considerando os valores encontrados com as ferramentas empregadas neste trabalho.

No entanto, vale ressaltar que esses resultados têm apenas valor preditivo para auxiliar na seleção de candidatos a fármaco, pois os cálculos baseiam-se em valores experimentais previamente encontrados para outras moléculas com características estruturais e disposição de grupos funcionais semelhantes. Deste modo, é necessário confirmá-los por meio de testes *in vitro*.

Os *dockings* conduzidos levaram à formação de complexos ligante-receptor cujos perfis de interação foram condizentes com os dados descritos na literatura. Ou seja, as waltherionas ciclizadas apresentaram interações com resíduos de aminoácidos importantes para a inibição reversível do sítio catalítico, em particular aqueles destacados como pontos-chave de interação para bloqueio da atividade proteolítica da M^{pro}. As waltherionas A e B foram particularmente interessantes, já que formaram mais ligações de hidrogênio com alguns destes resíduos chave do que a waltheriona C, mostrando um perfil de interações mais próximo daquele do ligante controle.

Contudo, muitos estudos que empregaram o *docking* molecular para investigar o perfil de estrutura-atividade tiraram conclusões precipitadas, especialmente em se tratando do mecanismo de inibição reversível, que é mais difícil de estabelecer do que aquele observado para os inibidores irreversíveis. Isto mostrou-se particularmente frequente nos estudos envolvendo a M^{pro}, uma vez que, em um primeiro momento (quando esta pesquisa começou em 2020), não havia ainda um grande número de artigos publicados descrevendo a elucidação estrutural do sítio catalítico.

Além disso, várias pesquisas que fizeram triagens moleculares partiram de um banco de dados similar e empregaram metodologias semelhantes, mas obtiveram

candidatos diferentes. Em alguns casos, não foi feita uma validação prévia de metodologia antes de rodar as simulações e nem uma distinção entre inibidores covalentes e não covalentes, cujos modos de ligação e de ação são bastante distintos. Estas observações são corroboradas pelo artigo de revisão de Macip e colaboradores (2021), que fez justamente um levantamento bibliográfico com o objetivo de fazer uma análise crítica e averiguar inconsistências em procedimentos de *docking* em artigos aprovados e publicados até então (MACIP et al., 2021).

Além disso, segundo o mesmo artigo, não foi encontrada uma correlação adequada entre a metade da concentração inibitória mínima (pIC50) e o *score* de *docking* ou com os valores de variação de energia livre de ligação (ΔG). De fato, alguns dos artigos analisados para a condução deste trabalho fizeram uma correlação direta entre a energia livre de ligação e o potencial inibitório *in vitro*, tirando conclusões precipitadas a respeito de seus resultados.

Portanto, levando em consideração as informações expostas, os resultados aqui alcançados sugerem afinidade a nível molecular das waltherionas ciclizadas pela M^{pro} por meio de interações não covalentes. Todavia, os valores energia e constantes de inibição calculados com a metodologia empregada, apesar de úteis para comparação dos resultados obtidos entre si, não apresentam uma correlação direta com o potencial inibitório *in vitro*. Por conseguinte, os resultados motivam a continuidade da investigação do potencial das waltherionas A, B e C como candidatos a inibidores da M^{pro} através de estudos de dinâmica molecular e testes *in vitro*.

4 REFERÊNCIAS

ADME - PreADME/Tox. Disponível em: <https://preadmet.qsarhub.com/adme/>.

ANTONOPOULOU, I. et al. Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 20, p. 1306–1344, 1 jan. 2022.

ARAFET, K. et al. Mechanism of inhibition of SARS-CoV-2 M pro by N3 peptidyl Michael acceptor explained by QM/MM simulations and design of new derivatives with tunable chemical reactivity. **Chemical Science**, v. 12, n. 4, p. 1433–1444, 4 fev. 2021.

ARAÚJO, J. L. et al. DFT, molecular docking, and ADME/Tox screening investigations of Market-Available drugs against SARS-CoV-2. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 8, p. 1628–1641, 2021.

Assault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment. Dassault Systèmes, , 2020. Disponível em: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>

BRADY, G. P.; STOUTEN, P. F. W. Fast prediction and visualization of protein binding pockets with PASS. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 14, n. 4, p. 383–401, 2000.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, N. Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. **SciMedCentral - JSM Chemistry**, v. 4, n. 3, 2016.

CHHETRI, A. et al. Exploration of inhibitory action of Azo imidazole derivatives against COVID-19 main protease (Mpro): A computational study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1224, p. 129178, 15 jan. 2021.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2012.

Coronavírus Brasil. Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 2 jul. 2023.

Coronavirus (COVID-19) | Drugs | FDA. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs>. Acesso em: 17 jun. 2023.

CRETTON, S. et al. Antitrypanosomal Quinoline Alkaloids from the Roots of Waltheria indica. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 10, p. 2304–2311, 24 out. 2014.

CRETTON, S. et al. Antifungal activity of quinoline alkaloids from Waltheria indica. **Planta Medica**, v. 81, n. 16, p. SL4C_02, 25 nov. 2015.

CRETTON, S. et al. Antifungal Quinoline Alkaloids from Waltheria indica. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 2, p. 300–307, 26 fev. 2016.

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 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 3 mar. 2017.

DAMPALLA, C. S. et al. Postinfection treatment with a protease inhibitor increases survival of mice with a fatal SARS-CoV-2 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 29, 20 jul. 2021.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition**. 3. ed. [s.l.] Wiley, 2009.

EL REFAEY, H. Fluoxetine. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, p. 1–9, 1 jan. 2007.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 1 jun. 2019.

FÖLLMANN, W. et al. Ames Test. **Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition**, p. 104–107, 1 jan. 2013.

GERHARD BRINGMANN, * et al. Biosynthesis of Antidesmone in Cell Cultures of Antidesma membranaceum (Euphorbiaceae): An Unprecedented Class of Glycine-Derived Alkaloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 41, p. 9905–9910, 18 out. 2000.

GILLET, V. J.; LEACH, A. R. Chemoinformatics. **Comprehensive Medicinal Chemistry II**, p. 235–264, 2007.

GOODFORD, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 849–857, 1985.

GREASLEY, S. E. et al. Structural basis for the in vitro efficacy of nirmatrelvir against SARS-CoV-2 variants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 6, p. 101972, 1 jun. 2022.

GUAN, L. et al. ADMET-score – a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **MedChemComm**, v. 10, n. 1, p. 148, 1 jan. 2019.

HANWELL, M. D. et al. **Avogadro: an open-source molecular builder and visualization tool**Avogadro, , 2016. Disponível em: <https://avogadro.cc/>

HORCHANI, M. et al. Synthesis and In Silico Docking Study towards M-Pro of Novel Heterocyclic Compounds Derived from Pyrazolopyrimidinone as Putative SARS-CoV-2 Inhibitors. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5303, 1 ago. 2022.

ISMAIL, E. M. O. A. et al. Quinoline and quinazoline alkaloids against Covid-19: An in silico multitarget approach. **Journal of Chemistry**, v. 2021, 2021.

KHARKAR, P. S.; WARRIER, S.; GAUD, R. S. Reverse docking: a powerful tool for drug repositioning and drug rescue. **Future medicinal chemistry**, v. 6, n. 3, p. 333–342, 2014.

KIM, S. et al. PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2016.

KNELLER, D. W. et al. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 24 jun. 2020a.

KNELLER, D. W. et al. Malleability of the SARS-CoV-2 3CL Mpro Active-Site Cavity Facilitates Binding of Clinical Antivirals. **Structure**, v. 28, n. 12, p. 1313- 1320.e3, 1 dez. 2020b.

LACZKO, R. et al. Anti-inflammatory activities of Waltheria indica extracts by modulating expression of IL-1B, TNF-α, TNFRII and NF-κB in human macrophages. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 525–540, 2020.

LASKOWSKI, R. A. SURFNET: A program for visualizing molecular surfaces, cavities, and intermolecular interactions. **Journal of Molecular Graphics**, v. 13, n. 5, p. 323–330, 1 out. 1995.

LEVITT, D. G.; BANASZAK, L. J. POCKET: A computer graphies method for identifying and displaying protein cavities and their surrounding amino acids. **Journal of Molecular Graphics**, v. 10, n. 4, p. 229–234, 1 dez. 1992.

LIMA, M. M. C. et al. Acetylcholinesterase Activity of Alkaloids from the Leaves of Waltheria brachypetala. **Planta Medica**, v. 75, n. 04, p. 335–337, 19 dez. 2008.

MACIP, G. et al. Haste makes waste: A critical review of docking-based virtual screening in drug repurposing for SARS-CoV-2 main protease (M-pro) inhibition. 2021.

MENGIST, H. M.; DILNESSA, T.; JIN, T. Structural Basis of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 7, 12 mar. 2021.

MEZEI, M. A new method for mapping macromolecular topography. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 21, n. 5, p. 463–472, 1 mar. 2003.

MORRIS, G. M. et al. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexiblity. **J. Computational Chemistry**, v. 16, p. 2785–91, 2012.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics 2011 3:1**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 7 out. 2011.

OGUNYEMI, O. M. et al. Dietary stigmastane-type saponins as promising dual-target directed inhibitors of SARS-CoV-2 proteases: a structure-based screening. **RSC Advances**, v. 11, n. 53, p. 33380–33398, 8 out. 2021.

OLIVEIRA, V. R. T. DE et al. COVID-19: FISIOPATOLOGIA E ALVOS PARA INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, 21 dez. 2020.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: a review. **Biophysical Reviews**, v. 9, n. 2, p. 91–102, 1 abr. 2017.

PDB-101: Learn: Guide to Understanding PDB Data: Methods for Determining Structure. Disponível em: <https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/methods-for-determining-structure>. Acesso em: 12 mar. 2023.

PENG SANG et al. Anti-HIV drug repurposing against SARS-CoV-2. **RSC Advances**, v. 10, n. 27, p. 15775–15783, 21 abr. 2020.

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, 14 maio 2015.

REN, S.; LIEN, E. J. Caco-2 cell permeability vs human gastrointestinal absorption: QSPR analysis. **Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques**, v. 54, p. 1–23, 2000.

ROSE, P. W. et al. The RCSB protein data bank: Integrative view of protein, gene and 3D structural information. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D271–D281, 1 jan. 2017.

SILVA, R. M. et al. Leishmanicidal and Antimicrobial Activities of 4-Quinolone Alkaloids from Stems of the Medicinal Plant *Waltheria indica* (Malvaceae) and Their Chemotaxonomic Significance. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 11, p. 1291–1298, 24 out. 2022.

STODDARD, S. V. et al. Optimization Rules for SARS-CoV-2 Mpro Antivirals: Ensemble Docking and Exploration of the Coronavirus Protease Active Site. **Viruses**, v. 12, n. 9, 1 set. 2020.

SUN, L. et al. In Silico Prediction of Compounds Binding to Human Plasma Proteins by QSAR Models. **ChemMedChem**, v. 13, n. 6, p. 572–581, 20 mar. 2018.

TAHIR UL QAMAR, M. et al. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10,

n. 4, p. 313–319, 1 ago. 2020.

TALLEI, T. E. et al. Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study. **Scientifica**, v. 2020, 2020.

THOMPSON, M. A. **Molecular Docking Using ArgusLab, an Efficient Shape-Based Search Algorithm and the a Score Scoring Function**, 2004. Disponível em: <http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>

TRIGGLE, D. J.; TAYLOR, J. B. Comprehensive Medicinal Chemistry II | ScienceDirect. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2007.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization and Multithreading. **Journal of Computional Chemistry**, v. 31, p. 455–461, 2010.

UMAR, H. I. et al. Molecular docking studies of some selected gallic acid derivatives against five non-structural proteins of novel coronavirus. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2021.

VANGEEL, L. et al. Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern. **Antiviral Research**, v. 198, p. 105252, 1 fev. 2022.

VARDHAN, S.; SAHOO, S. K. In silico ADMET and molecular docking study on searching potential inhibitors from limonoids and triterpenoids for COVID-19. **Computers in Biology and Medicine**, v. 124, n. January, p. 337–339, 2020.

VERMA, S.; LALL, N. Naturally Occurring Alkaloids with Anti-HIV Activity. **Medicinal Plants for Cosmetics, Health and Diseases**, p. 385–402, 20 jul. 2022.

VUONG, W. et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 27 ago. 2020.

WADANAMBI, P. M.; JAYATHILAKA, N.; SENEVIRATNE, K. N. A Computational Study of Carbazole Alkaloids from Murraya koenigii as Potential SARS-CoV-2 Main

Protease Inhibitors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 1, p. 573–596, 1 jan. 2023.

WEININGER, D. SMILES, a Chemical Language and Information System: 1: Introduction to Methodology and Encoding Rules. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 28, n. 1, p. 31–36, 1 fev. 1988.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 17 jun. 2023.

YADAV, R. et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells 2021, Vol. 10, Page 821**, v. 10, n. 4, p. 821, 6 abr. 2021.

YOSHINO, R.; YASUO, N.; SEKIJIMA, M. Identification of key interactions between SARS-CoV-2 main protease and inhibitor drug candidates. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 27 jul. 2020.

ZHANG, J. et al. Cholinesterase inhibitory isoquinoline alkaloids from Corydalis mucronifera. **Phytochemistry**, v. 159, p. 199–207, 1 mar. 2019.

ZONGO, F. et al. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Waltheria indica L. (syn. Waltheria americana): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 14–26, 21 jun. 2013.