



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

PABLLO ABREU ALVES

ESTUDOS DE DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE VITANOLÍDEOS DE
***ATHENAEA VELUTINA*: POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL**
DO SARS-CoV-2

FORTALEZA

2022

PABLO ABREU ALVES

ESTUDOS DE DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE VITANOLÍDEOS DE
ATHENAEA VELUTINA: POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DO
SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Teórica e Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Otília Deusdênia Loiola Pessoa

Coorientador: Prof. Dr. Norberto Kássio Vieira Monteiro

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A481e Alves, Pablo Abreu.

Estudos de docagem e dinâmica molecular de vitanolídeos de athenaea velutina: potenciais inibidores da protease principal do SARS-CoV-2 / Pablo Abreu Alves. – 2022.

67 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

Coorientação: Prof. Dr. Norberto Kássio Vieira Monteiro.

1. Dinâmica molecular. 2. Docagem molecular. 3. COVID-19. 4. Vitanolídeos. 5. Mpro. I. Título.

CDD 540

PABLLO ABREU ALVES

ESTUDOS DE DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE VITANOLÍDEOS DE
ATHENAEA VELUTINA: POTENCIAIS INIBIDORES DA PROTEASE PRINCIPAL DO
SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Teórica e Química Orgânica.

Aprovada em: 17/08/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Norberto Kássio Vieira Monteiro (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro de Lima Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Cristina Abreu e José Alves.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Um agradecimento especial à minha mãe e ao meu pai por terem acreditado na minha capacidade de fazer todo o meu trabalho. Meu pai morreu no ano passado, mas sei que ele ficaria orgulhoso de mim.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Lucas Lima, meu colega que ensinou quase tudo que sei sobre minha área de atuação e me ajudou a fazer este trabalho durante todas as etapas.

Ao professor Dr. Norberto de Kássio Vieira Monteiro, diretor do Grupo de Química Teórica (GQT), e a todos os meus colegas de laboratório, com destaque para Ámison Rick, Renato Veríssimo e Lucas Coutinho.

À professora Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, que foi minha orientadora. Ela é uma pessoa muito paciente e gentil, sempre em busca de melhorias no meu trabalho.

À minha querida amiga Luzia, que me apoiou.

À banca examinadora, pela atenção e disponibilidade.

“O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre” – Waldemar Valle Martins.

RESUMO

COVID-19 é o nome da doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 e que resulta, na maioria dos casos, em sintomas semelhantes aos de uma gripe comum, mas que pode causar problemas respiratórios, sendo seu impacto global resultante da sua fácil transmissibilidade. A pandemia global de COVID-19 levou a comunidade científica a dedicar seus esforços para encontrar antivirais eficazes capazes de tratar ou minimizar os efeitos causados pelo coronavírus SARS-CoV-2. Neste contexto, alguns alvos da estrutura viral podem ser escolhidos para o teste do potencial de inibição das substâncias estudadas, com destaque para a Protease Principal (M^{pro}), que é essencial para os processos de tradução e transcrição viral. Conhecendo a importância das plantas no desenvolvimento de fármacos, já que os produtos naturais são amplamente estudados e muitos possuem atividade antiviral descrita na literatura, inúmeros compostos estão sendo investigados para esta finalidade. Dentre esses compostos, pode-se citar os vitanolídeos, uma classe de lactonas esteroidais, que tem mostrado resultados positivos como inibidores da M^{pro} e outros alvos essenciais para o ciclo viral. Neste trabalho, foram estudados 4 vitanolídeos, o vitanolídeo (1), que é um composto novo isolado nesse trabalho, 27-desoxivitaferina A (2), 2,3-dihidro-27-desoxivitaferina A (3) e o vitanolídeo D (4) com o intuito de avaliá-los como possíveis inibidores da M^{pro} . Os compostos 1-3 foram isolados do extrato hexano/acetato de etila 1:1 de *Athenaea velutina* (Solanaceae), enquanto o 4 foi isolado das folhas de *Acnistus arborescens* (Solanaceae). As estruturas dos vitanolídeos foram determinadas usando uma combinação de análise de dados espectroscópicos (RMN, IV, HRESIMS). Em relação às atividades antivirais dos vitanolídeos 1 – 4 contra a M^{pro} , estudos de docagem e dinâmica molecular foram realizados. Com base nos resultados, o composto 1 apresentou os melhores resultados do desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (RMSD) e das energias de interação mesmo em comparação com o composto de referência 4, que já tem atividade contra o COVID-19 descrita na literatura.

Palavras-chave: dinâmica molecular; docagem molecular; COVID-19; vitanolídeos; M^{pro} .

ABSTRACT

The global COVID-19 pandemic has led the scientific community to dedicate its efforts to finding effective antivirals capable of treating or minimizing the effects caused by the SARS-CoV-2 coronavirus. In this context, some targets can be chosen to test the inhibition potential of the substances studied, mainly the Principal Protease (M^{Pro}), which is essential for the viral translation and transcription processes. Many natural compounds are being investigated for drug development because plants and natural products are crucial in medicine. Among these compounds, we can mention the withanolides, a class of steroidal lactones, which have shown positive results as inhibitors of M^{Pro} and other essential targets for the viral cycle. In this work, a new withanolide (**1**), together with the already known 27-deoxywithaferin A (**2**) and 2,3-dihydro-27-deoxywithaferin A (**3**), isolated from the 1:1 hexane/ethyl acetate extract of *Athenaea velutina* (Solanaceae), unlike withanolide D (**4**), which was previously isolated from the leaves of *Acnistus arborescens* (Solanaceae). The structures of the withanolides were determined using spectroscopic data analysis (NMR, IR, HRESIMS). In addition, docking and molecular dynamics studies were performed on the antiviral activities of withanolides **1** – **4** against M^{Pro}. Based on the results, compound **1** showed the best numbers regarding Mean Square Deviation of Atomic Positions (RMSD) and interaction energies.

Keywords: molecular dynamics; molecular docking; COVID-19; withanolides; M^{Pro}.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas dos vitanolídeos estudados	25
Figura 2 - Estrutura da protease principal	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.2	Vitanolídeos	27
1.3	Química Computacional	29
<i>1.3.1</i>	<i>Docagem Molecular</i>	30
<i>1.3.2</i>	<i>Dinâmica Molecular</i>	32
2	METODOLOGIA	34
2.1	Preparação do ligante	34
2.2	Docagem molecular	35
2.3	Dinâmica Molecular (DM)	35
3	RESULTADO	37
3.1	Artigo submetido	38
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A - SUPPLEMENTARY INFORMATION	69

1 INTRODUÇÃO

A química computacional é uma área em crescimento que combina métodos de química quântica e mecânica molecular voltados para investigar processos químicos, especialmente no desenvolvimento de fármacos, já que se trata de um método de alta eficiência capaz de avaliar uma quantidade muito grande substâncias ao mesmo tempo e selecionar aquelas que realmente são promissoras para um objetivo específico (FORMATO; SCHIEVANO; BIGLINO, 2022). Outra vantagem desses tipos de método é a possibilidade de evitar a formação de produtos secundários e a liberação de compostos tóxicos, que, mesmo quando devidamente descartados, envolvem uma logística complexa. Dentro de um cenário global, cada vez mais preocupado em encontrar formas de tratar doenças e combater agentes infecciosos, que se apresentam como desafios científicos, tecnológicos e sociais, esses métodos de alta eficiência associados a uma otimização de processos têm sido bastante valorizados (YANG *et al.*, 2021a).

Combinando a capacidade dos métodos computacionais com a necessidade científico-social, várias linhas de pesquisa foram criadas, o que vai desde a modelagem de novos fármacos (PALERMO; DE VIVO, 2015) ao desenvolvimento de rotas terapêuticas (GAROFALO *et al.*, 2020). Na busca por compostos bioativos, esses métodos podem servir como uma etapa preliminar aos vários experimentos de bancada, selecionando substâncias que realmente possuem potencial terapêutico e que possam trazer resultados promissores (SINGH; PANDEY; DUBEY, 2022).

Várias pesquisas indicam que os produtos naturais (PN), advindos de diversas fontes, como organismos marinhos, microrganismos, animais e plantas, assim como compostos derivados de PN, sempre desempenham e continuam a desempenhar importante papel no desenvolvimento de fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020), contribuindo para tratamentos virais e impulsionando os sistemas de saúde pública (ADHIKARI *et al.*, 2021). Uma classe de PN que tem sido estudada por seu potencial imunológico é a dos vitanolídeos, que acabam sendo alvos de vários testes por exibirem propriedades farmacológicas (*in vitro* e *in vivo*) (DHAWAN *et al.*, 2021), como anti-inflamatórias (LALLA HASNA ABDELJEBBAR *et al.*, 2009), ansiolíticas (BHATTACHARYA *et al.*, 2000), citotóxicas (BUDHIRAJA; KRISHAN; SUDHIR, 2000), imunomoduladoras (SHOHAT; JOSHUA, 1971), anti-neurodegenerativas (BAITHARU *et al.*, 2014) e anticancerígenas (YANG *et al.*, 2021b). Esses compostos também têm mostrado resultados promissores sobre o novo coronavírus (COVID-19), doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (SHREE *et al.*, 2022).

Dando destaque para a protease principal do SARS-CoV-2, já que ela é essencial no ciclo viral e a sua inativação poderia interromper a replicação e transcrição viral, pesquisas estão sendo desenvolvidas para avaliar possíveis inibidores. Com isso em mente, esse trabalho utilizou alguns vitanolídeos (Figura 1), previamente isolados e caracterizados por nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais - LAFIPLAM) dentro do projeto de análise computacional, tendo como resultado uma indicação do potencial inibidor desses compostos em relação à protease viral. Deste modo, conhecendo o potencial biológico dos vitanolídeos, foram empregados neste trabalho métodos computacionais para avaliar a atividade inibitória de quatro vitanolídeos em relação à protease viral.

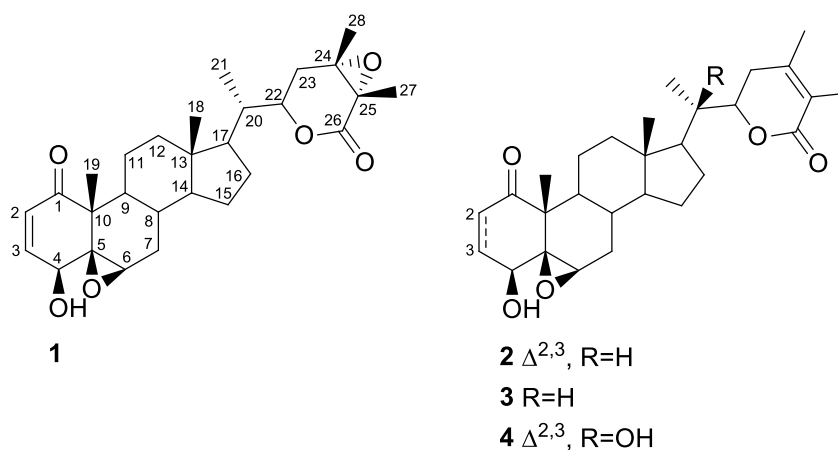


Figura 1: Estruturas dos vitanolídeos estudados

1.1 Coronavírus

Vírus são agentes infecciosos submicroscópicos, tendo em média entre 20-300 nm de diâmetro, que replicam dentro das células dos organismos vivos infectados. Quando um vírus não contaminou uma célula e nem está no processo de contaminação, ele é chamado de vírion, que é uma partícula composta por material genético, podendo ser DNA ou RNA, uma camada proteica nomeada de capsídeo e, em alguns casos, uma camada lipídica (Wu, Katherine J., 2020). A forma mais comum de classificar os diversos tipos de vírus é através da classificação de Baltimore, que leva em consideração o genoma viral e sua forma de transcrição (KOONIN; KRUPOVIC; AGOL, 2021).

Os vírus de RNA⁺ utilizam o ribossomo da célula alvo para realizar a sua replicação através da transcrição formadora de componentes virais. Por outro lado, o RNA⁻ não é reconhecido pelo ribossomo, necessitando passar por um processo de mudança estrutural.

Todos os vírus de RNA possuem suas próprias enzimas RNA replicase para criar cópias de si mesmo (PAYNE, 2017).

A primeira etapa do ciclo viral é a interação do vírus com a membrana celular, que ocorre através de ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e ligações iônicas com receptor da própria célula. Após a formação desse complexo ligante-receptor, o vírus penetra no citosol, onde ocorre, através de diversos mecanismos, a fusão do capsídeo com posterior liberação do material genético (SARDINHA, 2020).

Coronavírus é um grupo de vírus de RNA fita simples positiva capaz de causar doenças como a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). Em relação a essa família, o SARS-CoV-2 é o vírus causador da doença do novo coronavírus 2019 (COVID-19), que foi declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 11 de março de 2020, como uma pandemia. Existem poucas formas já validadas de tratar e evitar a doença, contando com terapias para diminuir os efeitos dos sintomas e vacinas como formas preventivas. O contágio ocorre pelo contato com os fluidos corporais, como os advindos da tosse e espirro, levando em consideração que o vírus pode sobreviver por um período de tempo em superfícies (BOOPATHI; POMA; KOLANDAIVEL, 2020).

O SARS-CoV-2 é composto por um genoma com valor próximo de 30000 nucleotídeos e 4 proteínas estruturais. A interação dessa estrutura com a célula humana se inicia com a formação do complexo ligante-receptor entre a espícula do vírus, que é dividida em grupo S1 (parte mais externa) e grupo S2 (parte mais interna), e o receptor ACE-2 da membrana celular humana, sendo responsável pelo controle da pressão arterial. Após essa interação, ocorre um processo de fusão ou “corte” da parte S1, que interage diretamente com o receptor, da parte S2, tendo as enzimas catepsinas e transmembrana serina 2 (TMPRSS-2) como auxiliares. Esse processo, embora tenha auxiliares, é favorável, já que existe um estado pré-fusão metastável e um pós-fusão estável (SHANG *et al.*, 2020).

Após o corte, o material genético entra na célula e dois terços do RNA viral do SARS-CoV-2 são traduzidos em duas cadeias longas de poliproteínas e o resto do genoma viral é transcrito em vários mRNA subgenômicos. Essas poliproteínas formadas, ppla e pplb, codificam proteínas não estruturais (nsp1-nsp16), que formam o complexo replicase e transcriptase viral. A quebra das poliproteínas ocorre com a atuação de duas enzimas essenciais, a protease do tipo papaína (PL^{pro}) e a protease principal (M^{pro}). O SARS-CoV transcreve 12 RNA's subgenômicos, que codificam as 4 proteínas estruturais (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), além de várias proteínas acessórias que não estão envolvidos na

replicação viral, mas podem interferir na resposta imune inata do hospedeiro (DE WIT *et al.*, 2016).

A furina é essencial para a transmissibilidade do SARS-CoV-2, já que ela auxilia tanto na fusão da espícula, quanto no transporte dos componentes virais formados dentro, mas ela não deve ser inibida por ser uma enzima importante no processo de renovação celular (PAYNE, 2017).

O SARS-CoV-2 depende do processo de conversão de estruturas (*frameshifting*) ribossômica entre duas grandes cadeias abertas (*Open Reading Frame-ORF*) do seu RNA (mRNA) para realizar a transcrição (BRANT *et al.*, 2021). O *frameshift* ocorre durante a tradução, indicando assim a correlação tradução-transcrição, etapas essenciais no ciclo viral (KHANAL *et al.*, 2021).

1.2 Vitanolídeos

PN são substâncias produzidas por organismos vivos. Esses compostos são metabólitos secundários, ou seja, são importantes para os seres vivos, mas podem ser extraídos sem inibir o funcionamento dos organismos (NATURE CHEMICAL BIOLOGY, 2007).

PN constituem uma das áreas mais importantes da química e uma das principais no estudo da saúde humana, seja na descoberta de novos fármacos, fitoterápicos ou fitomedicamentos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Isso contribui para que a área de PN seja a principal interface entre a química e a biologia, assim como uma fonte de estudos promissores, principalmente quando se leva em consideração a imensa biodiversidade a ser explorada (HONG, 2014).

O uso de PN como medicamentos regulamentados, assim como na forma de poções e drogas populares, vem desde os primórdios, o que pode ser constatado através de pesquisas arqueológicas, sociais e científicas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Dentre os PN mais relevantes para pesquisas relacionadas com a saúde pública, destacam-se os provenientes da família *Solanaceae*, caracterizada por plantas com flores, podendo se apresentar na forma de árvores, arbustos, cipós e ervas, e que possui grande importância econômica. As plantas dessa família são produtoras em potencial de vitanolídeos (*Acnistus*, *Aureliana*, *Brachistus*, *Browallia*, *Datura*, *Deprea*, *Discopodium*, *Dunalia*, *Exodeconus*, *Hyoscyamus*, *Iochroma*, *Jaborosa*, *Larnax*, *Lycium*, *Mandragora*, *Nicandra*, *Physalis*, *Salpichroa*, *Saracha*, *Solanum*, *Trechonaetes*, *Tubocapsicum*, *Vassobia*, *Withania*, and *Witheringia*) (GUPTA; PRASAD; AGGARWAL, 2016).

Dentre os produtos naturais, existem vários grupos que merecem destaque, como as lactonas esteroidais derivadas de ergosteno (vitanolídeos), muito estudados por apresentarem diversas atividades anticâncer (YANG *et al.*, 2021b) e possuírem uma gama de estruturas ainda não caracterizadas, possibilitando novas descobertas e aplicações (DHAR *et al.*, 2015).

Os PN também têm sido utilizados nas pesquisas contra a COVID-19, onde vários compostos são testados em alvos diferentes do SARS-CoV-2 (proteína *spike*, M^{pro}, PL^{pro}, RdRp e 3CL^{pro}) (SILVA *et al.*, 2021). A estrutura da protease, após obtenção da estrutura no site do protein data bank através do código 6LU7 (figura 2).

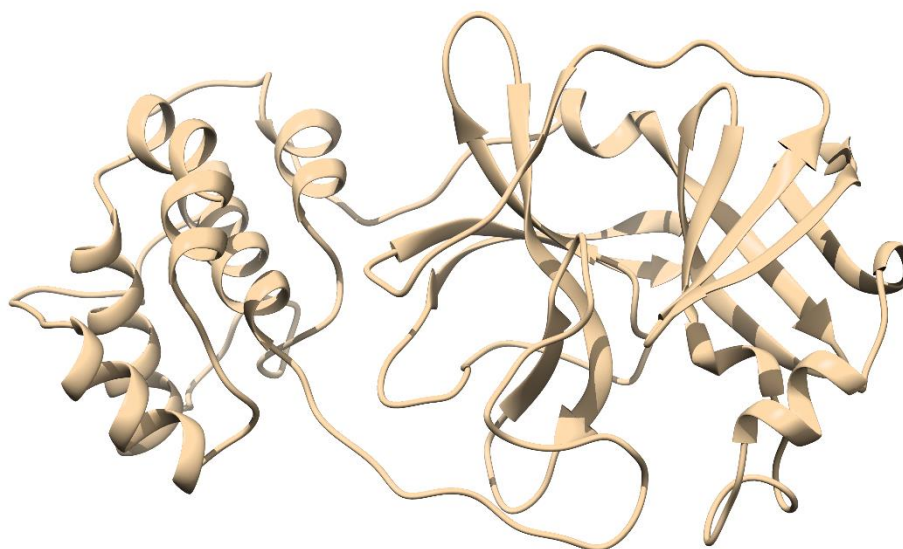


Figura 2: Estrutura da protease principal

Desde o início da pandemia de COVID-19, foi demonstrado que vitanolídeos exibem ação contra a vírus, seja inibindo a protease principal ou a transmembrana serina 2 (TM^{PRSS2}), ocasionando mudanças a nível de transcrição e tradução (DHANJAL *et al.*, 2021). Alguns vitanolídeos apresentaram alta afinidade com os sítios ativos das glicoproteínas espículas (*spike*) do vírus, que atuam no processo de fixação do vírus na célula hospedeira, se conectando com o receptor celular ACE 2 (TOMONARI *et al.*, 2016). Dentre os vitanolídeos estudados, pode-se destacar a alta afinidade dos vitanolídeos G e D com a PL^{pro} (KHANAL *et al.*, 2021), o potencial inibitório da vitaferina A em relação ao ACE 2 e a capacidade do vitanolídeo B de bloquear a proteína *Spike* (KALRA *et al.*, 2021). Com base nos resultados mostrados, fica claro o potencial destes compostos como agentes antivirais.

1.3 Química Computacional

Os métodos computacionais podem prever o acoplamento ligante-receptor entre ligantes e macromoléculas, formação de complexos e a interação fármaco-proteína, indicando as interações nos sítios (hidrofóbicas, eletrostáticas ou ligações hidrogênio) (O'ROURKE; GORMAN; BOEHR, 2016). Uma das formas de avaliação dessas interações é a docagem molecular (*molecular docking*), que pode ser realizado através de vários programas, como GOLD, AutoDock, FlexX e Molegro Virtual Docker (PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017).

Assim como os testes *in vitro* possuem uma contribuição muito grande na biomedicina, os estudos de produtos naturais e a descoberta de novos fármacos se beneficiaram com o desenvolvimento da química teórica (ROMANO; TATONETTI, 2019). Desenvolvimento de fármacos através de computadores (*computer-aided drug design - CADD*) é o termo utilizado para designar os experimentos e métodos das pesquisas computacionais, estando intrinsecamente atrelado aos métodos de alta eficiência (*high-throughput screening - HTS*), que possibilitam uma triagem acelerada e eficiente para a descoberta de novos compostos (SLIWOSKI *et al.*, 2013).

Dentre as análises que podem ser realizadas nesses programas, a interação ligante-proteína é uma das mais estudadas. A variação da energia de Gibbs para esse caso está descrita na equação 1, onde R é a constante dos gases ($R=1.99 \text{ cal mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta expressa em Kelvin, $K_{\text{equilíbrio}}$ é a constante de equilíbrio e $\Delta G_{\text{ligação}}$ é a variação da energia livre padrão de interação (DE AZEVEDO JR.; DIAS, 2008). O $\Delta G_{\text{ligação}}$ pode ser calculado através da variação de entalpia e entropia, como pode ser observado na equação 2.

$$\Delta G = G_{\text{ligação}} + RT \ln K_{\text{equilíbrio}} \quad (1)$$

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

A entropia pode ser descrita pela lei de Boltzmann, enquanto a entalpia do processo pode ser obtida pelo campo de força molecular. O primeiro átomo da interação é considerado em uma posição X, enquanto o segundo é posicionado em uma posição X_0 . Se $X = X_0$, a energia interna é nula, mas, quando os átomos se aproximam, a força da lei de Hook passa a agir no sistema e a energia interna começa a variar. Considerando K como a constante elástica, a energia pode ser dada como na equação 3 (DE AZEVEDO JR.; DIAS, 2008).

$$U(x) = \frac{1}{2} (X - X_0)^2 \quad (3)$$

A energia potencial não está relacionada unicamente ao estiramento molecular, mas está com a torção e o dobramento. Alguns parâmetros obtidos por cristalografia de raios-X e absorção no infravermelho, como densidade, entalpia de vaporização e energia de Gibbs de vaporização são considerados como energias de campo para fins de cálculo (DE AZEVEDO JR.; DIAS, 2008).

Uma das formas de interpretar essas interações ligante-receptor é através da mecânica molecular, que considera os átomos como corpos de massa definida e a ligação entre eles como uma mola (ERICKSON *et al.*, 2004).

1.3.1 Docagem Molecular

Como já abordado anteriormente, o *docking* busca os modos de ligação teoricamente mais próximos do real levando em consideração as energias de ligação e os parâmetros estruturais (MENG *et al.*, 2011). É comum o uso do chamado *Virtual Screening*, que simula a interação de possíveis candidatos utilizando grandes bancos de dados, ou o *Drug Repurposing*, que utiliza compostos já aprovados como medicamentos para outros alvos (PARVATHANENI, 2021). Existem outras formas de realizar essas simulações, como o *Blind Docking*, utilizando uma molécula sonda para identificar todos os possíveis sítios ativos do receptor, sendo muito útil para casos em que a superfície não é muito conhecida (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

O método do *docking* se inicia pela identificação, por parte do programa, da orientação do ligante e do receptor separadamente. Após isto, o programa aplica algoritmos para prever a orientação de pequenas moléculas nos sítios ativos. Essa etapa inicial pode ser um grande problema para moléculas orgânicas maiores, já que elas apresentam vários graus de liberdade. Uma forma de tentar contornar essa limitação é utilizando o *scoring*, que é um método de comparação com os algoritmos de um banco de dados pré-estabelecido, como o banco de dados internacional de proteínas (KITCHEN *et al.*, 2004).

Uma das funções de *scoring* é o Desvio da raiz quadrada média das posições atômicas (RMSD). O resultado do cálculo do RMSD deve estar na faixa de 1,0 – 2,0 Å entre a proteína-alvo e o ligante para que o *docking* seja considerado válido. Esse valor de referência do RMSD pode variar de acordo com o tipo de pesquisa e o objetivo a ser alcançado com o método e dá indícios da estabilidade da interação, já que um grande RMSD pode ser lido como de um ligante que está se deslocando dentro do espaço de simulação ao invés de se manter na região do sítio de ligação (KUFAREVA; ABAGYAN, 2012). Por esse motivo é importante utilizar um valor

de referência para o RMSD, expressando assim o quanto de estabilidade é considerada aceitável para a análise.

A forma dos programas de *docking* representarem os ligantes e os receptores tem muitas variantes, sendo a mais simples, que exige menor potência computacional e tempo de simulação, é a em que os dois são considerados estruturas rígidas, ou seja, sem liberdade de movimentação e mudança de ângulos internos. Porém, essa representação é uma aproximação que foge muito do real, onde o ligante e o receptor são flexíveis e mudam sua conformação de acordo com o tempo reacional, além de ocorrer uma mudança no sítio ativo conforme o ligante passa a interagir (modulação alostérica). Para se aproximar do real e manter um tempo mais curto de reação, o ligante pode ser representado por um núcleo rígido com hastes flexíveis ao seu redor, que representam longas cadeias, enquanto o receptor continua sendo rígido. Esse sistema busca abordar todos os graus de liberdade, sendo o núcleo programado diretamente nos sítios ativos no início da simulação, enquanto a parte flexível é adicionada aos poucos. A primeira etapa de análise tem foco na troca de hidrogênios (KITCHEN *et al.*, 2004).

O receptor pode ser representado de forma atômica, superficial e por grade potencial. A forma atômica é a forma mais simplificada, enquanto a superficial é mais utilizada para interação proteína-proteína (RUDDEN; DEGIACOMI, 2019). A grade de potencial (*Grid*) é interessante pelas várias possibilidades de análises de interação e cálculos de energia. A base desta representação é o armazenamento da contribuição energética do receptor em pontos de uma “grade”, que podem ser lidos durante o *scoring*. Existem duas formas básicas de armazenamento em pontos: interação eletrostática e Van der Waals (WU *et al.*, 2003).

A energia potencial eletrostática pode ser representada como a soma das energias de Coulomb (equação 4), sendo N o número de átomos nas moléculas A e B, q_i a carga elétrica do átomo i , q_j a carga elétrica do átomo j , r_{ij} a distância interatômica entre os átomos i e j , e ϵ a constante dielétrica (SARTORI; NASCIMENTO, 2019).

$$E_{coul}(r) = \sum_{i=1}^{N_a} \sum_{j=1}^{N_b} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (4)$$

O modelamento para interações de van der Waals é feito por Lennard–Jones, segundo a equação 5, sendo σ o parâmetro de colisão entre os átomos i e j .

$$E_{vdw}(r) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

1.3.2 Dinâmica Molecular

A Dinâmica Molecular (DM) é um dos métodos mais populares e potentes da área computacional, simulando o comportamento de estruturas e processos dentro de um espaço delimitado com características e variáveis controladas. Existem duas grandes divisões em relação a dinâmica, uma que leva em consideração a mecânica clássica, onde os átomos e ligações são regidos pelas mesmas leis que objetos macroscópicos (aproximação), e outra atrelada a métodos quânticos, onde a função de densidade eletrônica descreve o comportamento dos elétrons de valência para a formação de ligações químicas (GHOSH *et al.*, 2021).

Em relação ao método clássico, a DM gera trajetórias de um sistema de N partículas (os átomos são tratados como uma coleção de partículas unidas por forças harmônicas ou elásticas) presentes em uma caixa de simulação controlada que possui vários parâmetros pré-estabelecidos, como o campo de força. O campo de força é uma forma de descrever a interação entre os átomos, indicando parâmetros específicos para cada tipo de átomo, através das forças newtonianas que agem sobre os átomos (MONTICELLI; TIELEMAN, 2013). Os campos mais comuns incorporam uma função de energia potencial V_r , que pode ser escrita de forma simplificada como uma soma das contribuições do que está ligado e o que não está ligado (equação 6) (CHENG; IVANOV, 2012), mas pode ser dada como um somatório de várias contribuições diferentes (equação 7) (PONDER; CASE, 2003).

$$V_r = V_{ligado} + V_{n\grave{a}o\ ligado} \quad (6)$$

V_{ligado} : comprimento e ângulo de ligação e ângulo diedro.

$V_{n\grave{a}o\ ligado}$: interação de Van der Waals e de Coulomb

$$V_r = \sum_{ligações} K_b(b - b_0)^2 + \sum_{\hat{a}ngulos} K_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torções} K_\phi[\cos(n\phi + \delta) + 1]^2 + \sum_{pares\ n\grave{a}o\ ligantes} \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \frac{C_{ij}}{r_{ij}^6} \right] \quad (7)$$

Os dois primeiros termos descrevem deformações de comprimentos de ligação b e ângulos de ligação θ , assim como os valores de equilíbrio (b_0 e θ_0). A força harmônica dos termos, que inclui as constantes K_b e K_θ , garante a estrutura química. A rotação em torno das ligações envolve os termos n (número máximo de energia em uma rotação) e K_ϕ (altura da

barreira reacional), assim como $n\theta$ e δ , que são, respectivamente, o ângulo diedro e o ângulo de fase. Em relação ao quarto termo, q_i e q_j correspondem à magnitude das cargas pontuais de cada átomo e r_{ij} à distância entre os átomos i e j . A_{ij} e C_{ij} são as distâncias em que o potencial interparticular é zero (MACKERELL; BANAVALI; FOLOPPE, [s.d.]).

Antes da simulação da DM, devem ser feitas as minimizações de energia, em que o programa rearranja os átomos para encontrar a estrutura com menor tensão de cadeia das moléculas alvo. Aqui os comprimentos e ângulos de ligações são distorcidos em relação a posição inicial para se alcançar maior estabilidade (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

A equilibração de temperatura e pressão também é necessária e envolve métodos matemáticos - onde as variáveis são dadas em função de forças de interação e colisões, baseados no *ensemble* canônico - chamados de termostato e barostato. O resultado dessa equilibração é um gráfico oscilante de temperatura, simulada em um intervalo de tempo ao redor da temperatura desejada, definida previamente pelo operador. Uma menor oscilação e uma média de valores próxima da temperatura ideal são condições desejáveis (*input* do termostato) (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

A junção do *docking* com a dinâmica permite a previsão do modo de ligação do ligante e o efeito de ajuste induzido no receptor, contendo descrições mais precisas das energias envolvidas. Esse método conjunto contorna algumas aproximações, sendo que o *docking* pode auxiliar como uma forma de selecionar as moléculas mais promissoras (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

A imprecisão do *score* é parcialmente corrigida considerando as estruturas flexíveis nas dinâmicas, sendo de extrema importância escolher o campo de força a ser utilizado, já que ele carrega um conjunto de dados específicos para cada tipo de sistema. A DM também pode ser utilizada antes do *docking* para indicar novas conformações e depois do *docking* para realizar otimizações (BITENCOURT-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2019).

Os resultados da dinâmica (*output*) são dispostos em um gráfico de trajetórias do sistema, onde podemos observar todas as conformações possíveis do ligante e do receptor em intervalos de tempo reacional e a energia associadas a esses complexos, o que permite a identificação da conformação de menor energia (mais estável) e a de maior energia (esses estados podem ser transitórios, devido à alta instabilidade). Cada momento capturado em que se pode observar a conformação ligante-receptor é chamado de *frame*, destacando que o último *frame* pode ser escolhido para analisar as interações geradas na simulação, mas outras interações só podem ser

analisadas em outros momentos, já que ligações são feitas e desfeitas dentro do tempo reacional, assim como o sítio ativo tem sua superfície modificada constantemente (SILVA *et al.*, 2022).

As trajetórias da dinâmica são determinadas por equações de propagação, como a baseada nas relações newtonianas (equação 8). δt é o período de propagação, que acaba por afetar os termos a ele relacionados, como o momento q .

$$\frac{dq}{dt}(t + \delta t) = \left(\frac{dq}{dt}\right)_0 - \delta t \left[\left(\frac{\delta V}{\delta q}\right) \frac{1}{m_q} \right] \quad (8)$$

2 METODOLOGIA

2.1 Preparação do ligante

Os ligantes analisados computacionalmente, além do seu potencial, foram escolhidos pela disponibilidade regional, já que foram obtidos de uma família de plantas presente no Ceará, a *Solanacea*. Os ligantes foram previamente isolados das folhas da planta *Athenaea velutina* pelo Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais II (LAFIPLAM II) e as suas estruturas foram determinadas por cristalografia de raios-X com o auxílio do professor Dr. Alejandro Pedro Ayala. A parte computacional, que é o objetivo do trabalho, foi realizada no Grupo de Química Teórica da UFC, tendo suporte do CENAPAD - UFC (Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho - Universidade Federal do Ceará) e do Núcleo de Processamento de Alto Desempenho – NPAD da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Após a escolha dos ligantes a serem estudados, o pacote de programas do Marvin 17.21.0, ChemAxon *software* (<http://www.chemaxon.com>), foi utilizado para construir as microestruturas de cada molécula para, então, avaliar o estado de protonação conforme o pH vai sendo modificado. A obtenção dos estados de protonação é importante para saber se aquela estrutura possui cargas em uma faixa de pH (AHMED *et al.*, 2007). O pH de 7,4 foi o escolhido como padrão de avaliação, já que é o valor de referência para testes a serem realizados no corpo humano e é o valor médio do sangue.

Através do pacote de programas do Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2009), as otimizações foram realizadas, onde as estruturas foram sendo modificadas, seja em comprimento ou ângulos de ligações, de forma a atingir a conformação mais “relaxada” (ou seja, menos tensa e com menor energia). As configurações de otimização incluem o uso da Teoria do Funcional de Densidade (DFT), funcional B3LYP, que descreve as interações entre partículas e é o mais utilizado para moléculas pequenas, e conjunto de base 6-31G(d,p), normalmente aplicado para sistemas pequenos e não exigindo muito computacionalmente. O 6-31G (PETERSSON *et al.*,

1988) é um conjunto híbrido e leva em consideração a troca de correlação entre Hartree-Fock (FEHÉR, 1999) e *Ab initio* para realizar a conversão de equações diferenciais em equações algébricas, que são ideias para aplicação nos computadores.

2.2 Docagem molecular

A estrutura cristalina do M^{pro} associada ao inibidor N3 foi obtida através do site do Banco de Dados de Proteínas (PDB) sob o código de 6LU7 (HATADA *et al.*, 2020). Posteriormente, foi retirado o inibidor N3 através do programa Chimera versão 1.14 (PETTERSEN *et al.*, 2004), enquanto que a água e os íons foram removidos no MGL Tools (HOLT; CHAIRES; TRENT, 2008), que também foi utilizado para adicionar hidrogênio polares, que são essenciais para a estabilização de estruturas, e criar a caixa de *grid* ao redor do sítio ativo. A caixa seguiu os seguintes parâmetros: centros $x = -10.678$, $y = 27.322$ e $z = 66.294$; tamanho de $x = 40 \text{ \AA}$, $y = 40 \text{ \AA}$ e $z = 40 \text{ \AA}$. A docagem foi executada com o Autodock 1.5.6 (TROTT; OLSON, 2009) ao redor do átomo 145 (átomo de oxigênio) do resíduo de CYS 145 (Cisteína), que está incluído na díade catalítica da protease principal, presente na região P1. Todas as simulações de docagem utilizaram o Autodock Vina 1.2 com uma *exhaustiveness* de 16. Para avaliar as interações docadas, foi utilizado o programa UCSF Chimera 1.14.

2.3 Dinâmica Molecular (DM)

As “poses” produzidas pela docagem são utilizadas como estruturas de entrada (*input*) da DM. As simulações de DM foram realizadas pelo pacote de programas GROMACS 2019.2 (ABRAHAM *et al.*, 2015), implementado com o campo de força CHARMM27 (FELLER; MACKERELL, 2000). O SwissParam (HATADA *et al.*, 2020) foi utilizado para gerar as topologias dos ligantes.

O ambiente de simulação é baseado em uma caixa triclínica, escolhida por testagem, com solvatação de potencial de transferência intramolecular com 3 pontos de moléculas de água (TIP3P) (MARK; NILSSON, 2001), que é um tipo de solvatação explícita. A neutralização foi atingida com a adição de contra íons de sódio e a distância entre a proteína e os vértices da caixa foi definida como a mínima possível (1.0 \AA).

A minimização, que é uma etapa essencial no estágio pré-dinâmica, foi dividida em duas etapas, uma utilizando o integrador *Steepest Descent* (SD) (ARFKEN; WEBER; HARRIS, 2013) e outra com o Gradiente Conjugado (GC) (SHEWCHUK, 1994). A SD usou 10000 passos com $10 \text{ KJ nm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ de tolerância de energia e o GC 5000 passos com $10 \text{ KJ} \cdot \text{nm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

¹ de tolerância de energia. O termostato Nosé–Hoover (CHAMBERS, L. G.; FLETCHER, 2001) foi utilizado para fixar uma temperatura de estabilização do sistema (310 K) para todas as simulações (existe uma mudança cinética em cada etapa da simulação que acaba alterando a temperatura padrão do ambiente), enquanto que a pressão foi controlada utilizando o barostato Parrinello–Rahman (NOSÉ; KLEIN, 1983) com a pressão de referência de 1 bar. Duas dinâmicas curtas de equilíbrio com 200 ps foram feitas com *ensembles* NVT e NPT (conjuntos padrões de variáveis controladas). Após essas etapas curtas, uma produção de dinâmica de 250-ns usando *ensemble* NPT com um tempo de passos de 2.0 fs foi conduzida em triplicata para cada sistema, de forma a determinar a energia de interação entre os vitanolídeos e a M^{pro}.

O RMSD reflete a média das posições relativas dos átomos ligantes relacionados com a protease, permitindo uma análise visual gráfica, sendo uma ferramenta essencial para checar se o ligante flutua ao redor do sítio de ligação ou se desloca pela caixa de simulação (evento indesejado, visto que indica interação não efetiva). Depois do RMSD e análises de energia, o software VMD foi usado para produzir imagens dos ligantes dentro do sítio de ligação, selecionar os resíduos dentro do raio de 5 Å e diferenciar os resíduos da díade catalítica.

Para analisar a energia de interação entre os vitanolídeos **1 - 4** e M^{pro}, foi usado o *Interaction Potential Energy (IPE)* (KUMAR *et al.*, 2020), que pode ser definido como a energia de interação total entre dois grupos (a soma das contribuições de van der Waals e eletrostáticas) e foi calculado baseado na equação 7, onde IPE_{i,j} é a energia de interação entre um grupo de átomos i e um grupo de átomos j, com N_i e N_j sendo o total de átomos dos grupos i e j. V_{elec} e V_{vdw} correspondem a contribuições eletrostática e de van der Waals, respectivamente.

$$IPE_{i,j} = \sum_i^{N_i} \sum_{j \neq i}^{N_j} V_{vdw}(r_{ij}) + V_{elec}(r_{ij}) \quad (9)$$

Esses parâmetros são normalmente utilizados para avaliar as energias de interação nos sistemas proteína-ligante e proteína-proteína. Isso é necessário para caracterizar e classificar as interações entre ligantes e o receptor, de forma a obter dados importantes para estudos de desenvolvimento de drogas/medicamentos. Essas informações levam os estudos para um estágio mais profundo de compreensão dos candidatos a drogas, características moleculares e otimização (PARK; LEE; SEOK, 2015). O último *frame* (conformação ligante-receptor no último instante de simulação) em 250000ps foi utilizado para avaliar as interações por resíduos em um raio de 5 Å ao redor do ligante através do programa Gromacs. O cálculo foi feito como

uma média das 3 dinâmicas realizadas para cada composto mantendo as mesmas condições, resultando assim em um valor único de RMSD e um total de energia de interação, assim como o desvio padrão desses resultados. As energias de interação por resíduos foram obtidas para cada dinâmica.

É importante destacar que o ligante não foi restrito em um espaço, podendo assim se deslocar na caixa de simulação de forma livre. A realização de mais de uma dinâmica e a obtenção de resultados similares dentro do RMSD aceitável indica que esse ligante realmente se mantém no sítio de interação, não flutuando, como faria um composto que não interage com o receptor.

3 RESULTADO

Os resultados experimentais demonstraram um grande potencial dos vitanolídeos, que exibiram bons valores de interação, mesmo quando comparados com o composto de referência, o Vitanolídeo D, e de RMSD, mesmo não sendo fixados em uma região de interesse. Toda a metodologia, os resultados e as discussões estão presentes no trabalho submetido na *Journal Of Molecular Modeling*, exibido a seguir:

3.1 Artigo submetido

Withanolides of *Athenaea velutina* with potential inhibitory properties against SARS coronavirus main protease (M^{pro}): Molecular modeling studies

Pablo Abreu Alves,^{a,b} Késya Amanda D. Rocha,^b Lucas Lima Bezerra,^a Norberto de Kássio Vieira Monteiro,^{a*} Alejandro Pedro Ayala,^c Otília Deusdênia Loiola Pessoa^{b*}

^a*Departamento de Química Analítica e Físico Química, Centro de Ciências Ciências, Universidade Federal do Ceará, 60021-970, Fortaleza-CE, Brazil*

^b*Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 60021-970, Fortaleza-CE, Brazil*

^c*Departamento de Física, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 60440-900, Fortaleza-CE, Brazil.* * Corresponding author: opessoa@ufc.br

ABSTRACT

Since the beginning of the global COVID-19 pandemic, the scientific community has dedicated efforts to find effective antivirals able to treat or minimize the effects caused by the SARS-CoV-2 coronavirus. Some targets can be chosen as inhibitor substrates, highlighting the Main Protease (M^{pro}). Withanolides are a class of compounds of interest as possible inhibitors of M^{pro} and other critical targets of the virus. A new withanolide (**1**) together with the known 27-deoxywithaferin A (**2**) and 2,3-dihydro-27-deoxywithaferin A (**3**) was isolated from the leaf hexane/ethyl acetate 1:1 extract of *Athenaea velutina* (Solanaceae family), while withanolide D (**4**) was previously isolated from the leaves of *Acnistus arborescens*, also, a Solanaceae. The structures of the compounds were determined using a combination of spectroscopic (NMR, IR, HRESIMS) data analysis. In this study, we used computational chemistry tools such as docking and molecular dynamics (MD) techniques to analyze the activity of withanolides **1** – **4**. Based on our studies, withanolides **1** – **4** showed outstanding results in inhibition of SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}), a pivotal enzyme to the replication and transcription of the virus.

Keywords: Molecular dynamics, Molecular docking, COVID-19, Withanolides, M^{pro}

1 Introduction

Since 2019, the entire world has been plagued by the highly contagious and deadly viral disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), whose mortality rate has reached more than 4.5 million people [1]. Despite the efforts of scientists and researchers worldwide, even with vaccines, there is no effective drug available for the treatment of COVID-19 so far. Therefore, some key strategies may be taken to achieve treatment routes or effective drugs against COVID-19, and for that, it is vital to look for targets, whether they are from the human cell or the viral structure. Taking the SARS-CoV-2 components, because you can inhibit them without harming the human cells, the main protease (M^{pro}) acting together with the papain protease (PL^{pro}) produces the viral components for viral transmission and infection of new cells [2]. Furthermore, M^{pro} protease cleaves polyproteins at 11 sites resulting in the main NSP4-9 and NSP12-15 fragments, highlighting that NSPs from RNA complex are involved in many processes for the new virus in the host [3]. Previous studies showed that the M^{pro} of the SARS-CoV-2 is a good target for computational simulations because it plays an important role in the transcription and replication processes of the virus [4].

Proteases are enzymes that selectively catalyze the hydrolysis of peptide bonds resulting in protein degradation [5]. They are classified according to the active site used in catalysis (serine, cysteine, threonine, aspartic, metallo, and glutamic proteases). Usually, the proteases act on signaling pathways irreversibly, controlling many physiological processes. Therefore, protease inhibitors can be classified according to their mechanism of inhibition or by the physiological outcome or relevance of the inhibition [6].

The M^{pro} is a homodimer that contains three domains, considering that the binding site is between chymotrypsin-like domain I and picornavirus 3C protease-like domain II [7,8]. There are 13 different binding regions for M^{pro} , designed PI (I = 1-13), where P1 encompasses the HIS 141 and CYS 145 catalytic dyad, which are imperative to the substrate-binding mechanism. Also, it is essential to highlight that the inhibitors can act as much as at covalent and non-covalent routes, both interacting with the active site or adjacents to it (working as a block group). All in all, a small-molecule inhibitor would be selective for its target, having excellent characteristics, like absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicology (ADMET) parameters for acute and chronic use [6]. A studied interaction mechanism occurs when the inhibitor binds the protease noncovalently, and then a stable covalent bond is formed through a nucleophilic attack led by CYS 145 [9].

Another crucial step, after the selection of the target, is the establishment of possible inhibitors. The role of natural products in pharmacotherapy and drug discovery is secular and unquestionable, particularly for cancer and infectious diseases [10,11]. One important class of natural products which is in focus is the withanolides, a large

group of C28 steroidal lactones based on the ergostane skeleton where the carbons 22, 23, and 26 can be oxidized to form a C22/C26 δ -lactone [12] or less commonly, to form a C23/C26 γ -lactone moiety [13,14]. These secondary metabolites are the active metabolites of many botanical Solanaceae family medicinal plants. These compounds have demonstrated anti-inflammatory [15], anxiolytic [16], cytotoxic [17], immunomodulatory [18], anti-neurodegenerative [19], and antimicrobial activities [20] and showed promising anti-cancer properties [21,22]. It is also worth noting that, recently, several studies point out the withanolides as good antiviral candidates to be analyzed against the SARS-CoV-2 since several of them exhibited *in silico* activity against the new coronavirus main protease [24,25].

With the target and the ligand being chosen, it is crucial to establish the analysis methodology and the project's primary technique. A significant advance in new drug discovery has been molecular modeling [26], which has established itself as a vital tool for planning and discovering new drugs or optimizing an existing prototype, creating and accelerating new drug possibilities [27]. One of the most prominent molecular modeling techniques is Molecular docking [28], which predicts the conformations and theoretical connections of the ligand that are supposed to interact in the protein's active site based on previous structural information and interaction energies [29]. With the possibility of working as a docking coupled technique and visualizing the process broadly, Molecular Dynamic (MD) gives a trajectory of interaction, considering flexible structures and showing the complex stability [30].

This work describes a computational evaluation using molecular docking and MD of four withanolides (**1** – **4**) as inhibitors of the M^{pro} of SARS-CoV-2. Withanolides **1** – **3**, including a new one (**1**), were isolated from leaves of *Athenaea velutina*, while withanolide D (**4**), which was used as a comparative compound due to its relevance as an inhibitor of SARS-CoV-2 [8].

2 Experimental

2.1 General experimental procedures

Melting points were performed on a digital MQAPF-302 apparatus. IR spectra were recorded using Shimadzu IR-tracer-100 spectrometer. NMR spectra were acquired on a Bruker AVANCE DPX-300 spectrometer operating at 300.13 MHz for ¹H and 75.48 MHz for ¹³C. High-resolution electrospray ionization mass spectra (HRESIMS) were acquired on an Acquity Xevo UPLC-QTOF-MS spectrometer from Waters. Chromatographic separations were performed on silica gel 60 (0.063–0.200 mm and silica gel 40 μ m flash chromatography packing (Merck), while analytical TLC was performed on pre-coated 200 μ m thick plates on silica gel 60 with fluorescent indicator

F-254 (Silicycle).

2.2 Plant material

The leaves of *Athenaea velutina* were collected in January 2019 (S 04° 12.590', W 38° 58.244') at Guaramiranga county, Ceará State-Brazil, under the license number A5C2E09. Plant material was identified by Dr^a Valéria Sampaio, and a voucher specimen (EAC45010) is deposited at the Herbário Prisco Bezerra (EAC), Universidade Federal do Ceará (UFC).

2.3 Extraction and isolation

At room temperature, the dried and pulverized leaves of *A. velutina* (2.0 Kg) were extracted with hexane/EtOAc 1:1 (10 L, 3 x 24 h each). The solvent was removed by evaporation under reduced pressure yielding 95.0 g of crude extract. This extract (90.0 g) was fractionated on silica gel (60.0 g) eluted with hexane, hexane/EtOAc 2:1 and 1:1, EtOAc, EtOAc/MeOH 1:1, and MeOH to afford nine fractions (A to I), after Thin Layer Chromatography (TLC) analysis. Fraction E (8.30 g) eluted by hexane/EtOAc 2:1 was subjected to further silica gel column chromatography (100.0 g) eluting with the gradient solvent system of hexane/EtOAc 9:1, 7:3, 5:5, 4:6, 3:7, 8:2, EtOAc, and finally, EtOAc/MeOH 1:1 to yield nine subfractions (EA to EI). Subfraction EE (2.24 g), a greenish solid, was repeatedly recrystallized at EtOAc, to generate a pure compound **1** (383 mg). Fraction F (8.35 g), a dark precipitate, was initially washed with EtOAc, and the resulting material (Fp 4,12 g) was subjected to a silica gel column chromatography eluted with CH₂Cl₂/acetone 5% to yield seven subfractions (FpA to FpG). Subfraction FpB (2.24 g) was subjected to a silica gel flash column chromatography (120.0 g), eluted with CH₂Cl₂/acetone 5% to afford compounds **1** (1.49 g) and **2** (436 mg). Subfraction FpD (481 mg) was also subjected to a silica gel flash column chromatography (50.0 g, eluted with CH₂Cl₂/acetone 3% to yield compounds **2** (144 mg) and **3** (148 mg).

27-Deoxy-24,25-epoxywithaferin A (**1**): Colourless crystals (acetone); mp 212-214 °C; IR (KBr) ν_{\max} 3498, 1720, 1676, 1458, 1398, 1309, 1155, 1031 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃): 6.93 (1H, dd, *J*=9.9, 5.8 Hz, H-3), 6.20 (1H, d, *J*=9.9 Hz, H-2), 4.52 (1H, td, *J*=7.6, 3.5 Hz, H-22), 3.75 (1H, d, *J*=5.8, Hz, H-4), 3.22 (1H, s, H-6), 2.14 (2H, dt, *J*=14.8, 2.7 Hz, H-7), 1.94 (2H, m, H-12), 1.94 (2H, t, *J*=7.6 Hz, H-23), 1.89 (1H, m, H-20), 1.81 (2H, m, H-11), 1.71 (2H, m, H-16), 1.62 (2H, m, H-15), 1.55 (3H, s, H-27), 1.49 (1H, d, *J*=3.8 Hz, H-8), 1.47 (3H, s, H-28), 1.44 (2H, m, H-11), 1.39 (3H, s, H-19), 1.35 (2H, m, H-16), 1.29 (2H, m, H-7), 1.14 (2H, m, H-15), 1.09 (2H, m, H-12), 1.03 (1H, m, H-17), 0.99 (1H, m, H-9), 0.94 (1H, m, H-14), 0.89 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 0.67 (3H, s, H-18);

^{13}C NMR (CDCl_3): 202.4, C (C-1), 170.2, C (C-26), 142.1, CH (C-3), 132.5, CH (C-2), 76.4, CH (C-22), 70.1, CH (C-4), 64.0, C (C-5), 62.8, C (C-24), 62.6, CH (C-6), 59.5, C (C-25), 56.3, CH (C-14), 52.2, CH (C-17), 47.9, C (C-10), 44.3, CH (C-9), 42.8, C (C-13), 39.5, CH_2 (C-12), 38.8, CH (C-20), 31.4, CH_2 (C-7), 30.0, CH (C-8), 29.0, CH_2 (C-23), 27.4, CH_2 (C-16), 24.4, CH_2 (C-15), 22.3, CH_2 (C-11), 18.1, CH_3 (C-28), 17.5, CH_3 (C-19), 13.8, CH_3 (C-27), 13.2, CH_3 (C-21), 11.8, CH_3 (C-18); HRESIMS m/z 493.2556 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{NaO}_6$, 493.2566).

27-Deoxywithaferin A (**2**): White crystals (acetone); mp 194-196 °C. IR (KBr) ν_{max} 3394, 1683, 1458, 1396, 1134, 1039 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data on SI.

27-Deoxy-2,3-dihydrowithaferin A (**3**): White crystals (acetone); mp 187-189 °C. IR (KBr) ν_{max} 34048, 1707, 1687, 1450, 1396, 1315, 1134 cm^{-1} ; ^1H and ^{13}C NMR data on SI.

2.4 X-ray crystallographic analyses of compounds 1 - 3

The data collection of single-crystal X-ray (ϕ scans and ω scans with κ and θ offsets) was recorded on a Bruker D8 Venture κ -geometry diffractometer equipped with a Photon II CPAD detector and a Cu $\text{K}\alpha$ ($\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) $\text{I}\mu\text{S}$ 3.0 Incoatec microfocus source. The APEX III software was used for the unit cell determination and data collection [31]. The data reduction and global cell refinement were made using the Bruker SAINT [32]. Data were corrected for absorption effects with SADABS [33]. The structures were solved by intrinsic phasing using SHELXT [34] and refined with the ShelXL [35] refinement package using Least Squares minimization using Olex as a graphical interface. Non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms were placed according to geometrical criteria and treated using the riding model. Crystallographic data for the structures have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre. These data can be obtained free from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/structures.

X-ray Crystallography Analysis of 27-deoxy-24,25-epoxywithaferin A (**1**): Clear light colourless irregular crystals of compound **1** were obtained from acetone recrystallization. $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_6$, $M_r = 470.58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; size 0.214×0.283×0.764 mm. The crystalline system was orthorhombic, space group $\text{P}2_1 2_1 2_1$ and the final cell constants were $a=9.5300(12) \text{ \AA}$, $b=10.0814(12) \text{ \AA}$, $c=26.783(3) \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$; $V = 2573.2(5) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho_{\text{calc}}=1.215 \text{ g cm}^{-3}$, $F(000) = 1016$. Data were corrected for absorption effects using the numerical method. A total of 29015 reflections were collected in the range 9.85 to 140.37 (0.82 \AA) (completeness = 97.6 %), with 4795 independent reflections ($R_{\text{int}} = 0.0318$, $R_{\text{sigma}} = 0.0237$) which were used in all calculations. Final indices: $R_{1\text{obs}}$

= 0.0350, $\omega R2_{obs}$ = 0.0935 [$I \geq 2\sigma(I)$]; $R1_{all}$ = 0.0359, $\omega R2_{all}$ = 0.0974 [all data], goodness of fit on F2 was 1.042. The stereochemistry of the molecule was evidenced by the following parameters: Flack x = 0.07(4), Parsons z = 0.07(4), Hooft y = 0.09(4). Crystallographic data for **1** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as deposit no CCDC 2084957.

X-ray Crystallography Analysis of 27-deoxywithaferin A (**2**): Clear light colourless plate crystals of compound **2** were obtained from acetone recrystallization. $C_{28}H_{38}O_5$, M_r = 476.22 $g \cdot mol^{-1}$; size 0.086×0.363×0.552 mm. The crystalline system was orthorhombic, space group $P2_1 2_1 2_1$ and the final cell constants were $a=7.7019(2)$ Å, $b=10.3098(3)$ Å, $c=33.8786(7)$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$; $V = 2690.13(12)$ Å³, $Z = 4$, $\rho_{calc}=1.176$ $g \cdot cm^{-3}$, $F(000) = 1027$. Data were corrected for absorption effects using the numerical method. A total of 10613 reflections were collected in the range 12.63 to 140.10 (0.82 Å) (completeness = 97.9 %), with 4978 independent reflections ($R_{int} = 0.0305$, $R_{sigma} = 0.0422$) which were used in all calculations. Final indices: $R1_{obs} = 0.0599$, $\omega R2_{obs} = 0.1728$ [$I \geq 2\sigma(I)$]; $R1_{all} = 0.0624$, $\omega R2_{all} = 0.1758$ [all data], goodness of fit on F2 was 1.049. The stereochemistry of the molecule was evidenced by the following parameters: Flack x = 0.01(10), Parsons z = -0.05(11), Hooft y = -0.02(11). Crystallographic data for **2** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as deposit no CCDC 2084958.

X-ray Crystallography Analysis of 27-deoxy-2,3-dihydrowithaferin A (**3**): Clear light colourless plate crystals of compound **3** were obtained from acetone recrystallization. $C_{28}H_{40}O_5$, M_r = 456.60 $g \cdot mol^{-1}$; size 0.09×0.11×0.35 mm. The crystalline system was orthorhombic, space group $P2_1 2_1 2_1$ and the final cell constants were $a=7.6790(2)$ Å, $b=10.5223(3)$ Å, $c=33.9196(8)$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$; $V = 2740.73(12)$ Å³, $Z = 4$, $\rho_{calc}=1.107$ $g \cdot cm^{-3}$, $F(000) = 992$. Data were corrected for absorption effects using the numerical method. A total of 29350 reflections were collected in the range 9.89 to 140.37 (0.82 Å) (completeness = 98.8 %), with 5191 independent reflections ($R_{int} = 0.0457$, $R_{sigma} = 0.0270$) which were used in all calculations. Final indices: $R1_{obs} = 0.0397$, $\omega R2_{obs} = 0.1046$ [$I \geq 2\sigma(I)$]; $R1_{all} = 0.0493$, $\omega R2_{all} = 0.1153$ [all data], goodness of fit on F2 was 1.023. The stereochemistry of the molecule was evidenced by the following parameters: Flack x (Twin) = 0.4(3), Parsons z = 0.01(9), Hooft y = 0.04(8). Crystallographic data for **3** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre as deposit no CCDC 2084959.

2.5 Computational section

2.5.1 Ligand preparation

The protonation states of the molecules significantly influence their mode of interaction with the receptor [36]. Therefore, based on the pKa values, the protonation states of the studied withanolides were calculated using the Marvin 17.21.0, ChemAxon software (<http://www.chemaxon.com>), considering the structures at pH = 7.4, since it is the standard pH value for human body interaction evaluations [37]. Optimization calculations [38] were performed by using Density Functional Theory (DFT) [24-26] method at B3LYP functional [38] along with 6-31G(d,p) [41] basis set implemented in Gaussian 09 package [42].

2.5.2 Molecular Docking

Molecular docking was performed to obtain the best conformation (pose) of the ligands at the active site of the M^{pro}. The crystal structure of SARS-CoV-2 M^{pro} was obtained from Protein Data Bank (PDB) website under the code 6LU7 [43], removing the water molecules, ions, and other ligands present in the protein target. The Chimera 1.14 version software [44] was used to remove the inhibitor N3, present with the virus structure in the PDB. MGL tools [45] were used to remove water, add polar hydrogens and build a grid box around the active site with the following parameters for the binding site: centres $x = -10.678$, $y = 27.322$ and $z = 66.294$; size of $x = 40 \text{ \AA}$, $y = 40 \text{ \AA}$ and $z = 40 \text{ \AA}$. The molecular docking was accomplished with the Autodock 1.5.6 [46] around atom 145 (oxygen atom, O145) of the CYS145 residue, which is included in the M^{pro} catalytic dyad, present in the P1 region [47]. Autodock Vina 1.2 [32,33] software developed by Scripps Research Institute was employed for all the molecular docking simulations. The program used as the binding analysis software option was UCSF Chimera (version 1.14) [50]. The used exhaustiveness was 16.

2.5.2 Molecular dynamics simulations

Receptor-withanolide complexes containing ligands with the lowest energy pose were used as input for MD simulations. The MD simulations were performed using the GROMACS 2019.2 software package [52] implemented with the CHARMM27 force field [36,37]. The topologies of the studied ligands were generated by the SwissParam force field generation tool [55]. The simulation environment was based on a triclinic box with the solvation using transferable intramolecular potential with 3 points (TIP3P) water molecules [56]. The systems neutralization was achieved by adding counter ions, and the distance between the protein and the edges was set to be as minimum as possible (1.0 \AA).

The minimization step was divided into two parts: steepest descent integrator (SD) [40,41] and conjugate gradient (CG) [59]. The SD used 10000 steps with 10 KJ nm⁻¹.mol⁻¹ of energy tolerance and the CG 5000 steps with 10 KJ.nm⁻¹.mol⁻¹ of energy tolerance. The Nosé–Hoover thermostat [23,43] was used to fix the system temperature (310 K) in all simulations, while the system pressure was controlled using a Parrinello–Rahman barostat [61] with a pressure reference value of 1 bar. Two short 200-ps equilibrium dynamics with NVT and NPT ensembles [62]. Finally, 250-ns production MD simulation using an NPT ensemble with a time step of 2.0 fs was conducted in three replicates for each system to determine the interaction energy between the withanolides ligands and M^{pro}.

To analyze the interaction energy between withanolides **1** – **4** and M^{pro}, was used the Interaction Potential Energy (IPE) [63], which can be defined as the total interaction energy between two groups (the sum of van der Waals and electrostatic contributions) and was calculated according to the **equation (1)**, where IPE_{i,j} is the interaction energy between a group of atoms i and a group of atoms j, and N_i and N_j are the total numbers of atoms on groups i and j. V_{elec} and V_{vdw} correspond to electrostatic and van der Waals contributions, respectively.

$$IPE_{i,j} = \sum_i^{N_i} \sum_{j \neq i}^{N_j} V_{vdw}(r_{ij}) + V_{elec}(r_{ij}) \quad (1)$$

These parameters are often used to evaluate interaction energies in protein-ligand and protein-protein systems [63]. It is necessary to characterize and classify the interactions between ligand and receptor to obtain valuable data for studies of rational drug design. This information leads to a more profound knowledge of drug candidates' function, molecular recognition, and optimization [64]. The last frame of the complex dynamics at 250000ps was used to evaluate the interaction per-residue in a radius of 5 Å around the ligand with the Gromacs *software* (**Table 2**). A calculation was made among the three dynamics to each ligand to yield a unique average RMSD value and total interaction energy and the standard deviation for these values. The residues interaction energies were obtained for each dynamics.

The RMSD reflects the average relative positions of the ligands atoms concerning protease allowing visual graphic analyses, a critical tool to check if the ligand is fluctuating around the pocket or dislocating through the simulation box (an undesirable event since it indicates no effective interaction) [65]. After the RMSD and energy analyses, VMD *software* [56,57,58] was used to produce images of the ligands inside the binding site, select the residues of the 5 Å cut, and differentiate the residues of the catalytic dyad (**Fig. 5**).

3 Results and discussion

3.1 Structure elucidation

Three withanolides were isolated from the hexane/ethyl acetate 1:1 soluble fraction from leaves of *A. velutina*. Their structures were established using IR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR, HRMS, X-ray crystallographic techniques, and EDC calculations.

Withanolide **1** had its molecular formula assigned by HRMS as $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_6$ (ten degrees of unsaturation) from the $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ion peak at m/z 493.2556. Its IR spectrum displayed absorption bands at 3498 cm^{-1} to hydroxyl and 1720 and 1676 cm^{-1} to unsaturated carbonyls of lactone and ketone, respectively. The ^{13}C NMR, DEPT 135° and HSQC spectra showed signals to 28 carbon atoms ascribed to ten methines, including two olefinic at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 6.93/142.1 (C-3) and 6.20/132.5 (C-2) and three oxygenated at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 4.76.4 (C-22), 3.756/70.1 (C-4), and 3.22/62.6 (C-6); six methylenes, five methyls at $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ 1.47/18.1 (C-28), 1.39/17.5 (C-19), 1.55/13.8 (C-27), 0.89/13.2 (C-21) and 0.67/11.8 (C-18), and eight quaternary carbons, including two carbonyls at δ_{C} 202.4 (C-1) and 170.2 (C-26). Furthermore, the system 5,6-epoxy-4-hydroxy- α,β -unsaturated ketone was confirmed by the HMBC correlations for the proton at δ_{H} 6.93 (H-3) with the carbons at δ_{C} 202.4 (C-1) and 64.0 (C-5), for the protons at δ_{H} 6.20 (H-2) and 3.22 (H-6) with δ_{C} 70.1 (C-4), and δ_{H} 3.75 (H-4) with δ_{C} 132.5 (C-2) and 47.9 (C-10). Additionally, correlations of the oxymethine at δ_{H} 4.52 (H-22) with δ_{C} 62.8 (C-24) and 13.2 (C-21) and of the methyl at δ_{H} 1.12 (H-27) with δ_{C} 170.2 (C-26), 62.8 (C-24) and 59.5 (C-25), showed a 24,25-epoxy moiety in the δ -lactone withanolide. Based on the complete ^1H and ^{13}C NMR spectra (see experimental data) and single-crystal X-ray diffraction analysis (**Fig. 2** and **Fig. 3**), the structure of withanolide **1** was established as 5 β ,6 β -epoxy-4 β -hydroxy-1-oxowitha-2-enolide which was named 27-deoxy-24,25-epoxywithaferin A, due to the similarity with the 27-desoxywithaferin A derivative, a withanolide previously isolated of *Withania somnifera* [49,50].

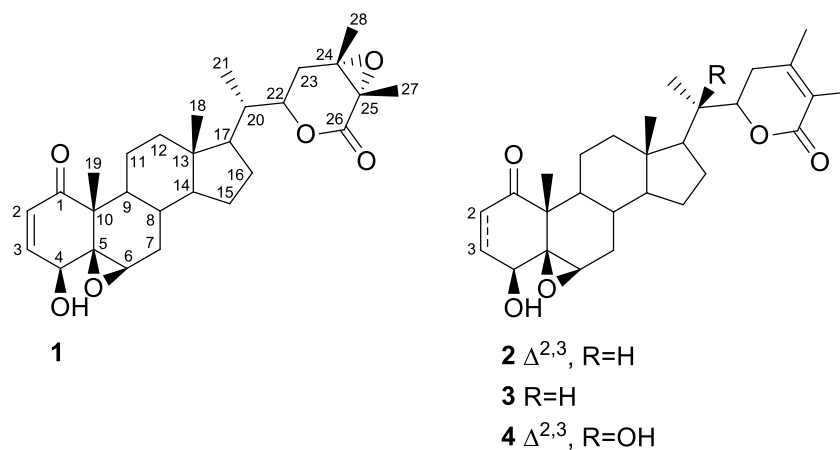


Fig. 1 Structures of the withajardins 1 – 4

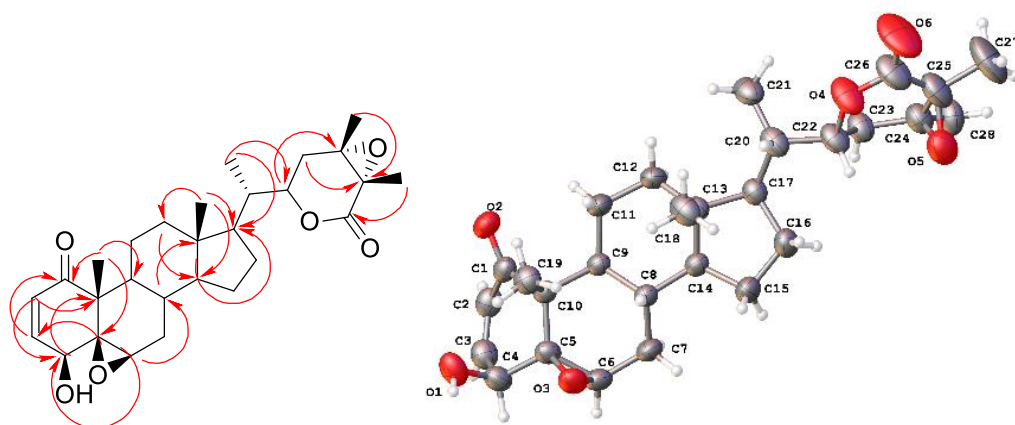


Fig. 2 Key HMBC and X-ray ORTEP drawing of withanolide 1

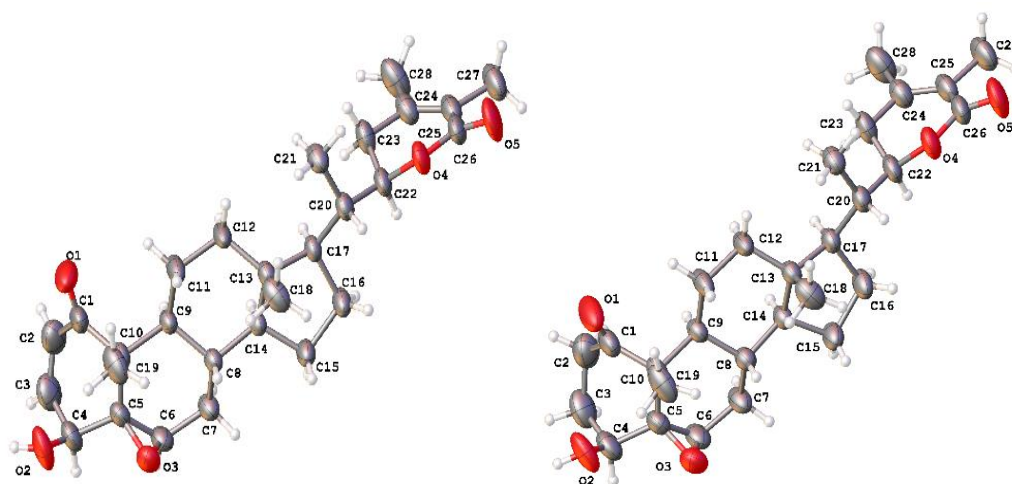


Fig. 3 X-ray ORTEP drawing of withanolides 2 and 3

3.2 Ligand and target preparation

The results of the microspecies at pH = 7.4 distribution showed that all the analyzed ligands have the uncharged state as the major (**Figure S1**). Therefore, before beginning the molecular simulation analysis,

the ligands needed to be optimized to overcome contact problems between atoms and achieve the coordinates with less potential energy (**Fig. 3**) [71]. This geometry optimization/minimization process changes the atomic position to relax the distortions in chemical bonds, connection angles, and Van der Waals contact [72], providing the optimized structures of **1 – 4** shown in **Fig. 4**.

3.3 Molecular docking results

The lowest energy pose of each ligand with the best RMSD value was used to perform the molecular docking (lower than 2Å). The calculated affinities of each ligand were -8.3 kcal.mol⁻¹, -7.9 kcal.mol⁻¹, -7.9 kcal.mol⁻¹, and -7.7 kcal.mol⁻¹ for **1 – 4**, respectively, showing similarity between the modes of interaction for each receptor and ligand (**Figures S2 and S3**).

This paper focuses on molecular dynamics results and energies of interaction, considering the molecules like flexible structures that change conformation as they interact with the receptor. Moreover, the docking showed that the binders are acceptable for further analysis based on their RMSD and interaction energies [51,15].

3.4 Molecular dynamics results

In MD simulations, the interaction and the equilibrium of the protein-ligand complexes are calculated in motion. Therefore, relevant configurations of the receptor-ligand complex can be achieved, which are inaccessible for molecular docking calculations.

Encouraged by the inhibitory activity of withanolides, particularly withaferin A, withanone, and withanolide D (**4**) against the SARS-CoV-2 [53,54], MD simulations were performed using **1 – 4** to obtain their *IPE* values against the M^{pro}. As a result, the root means square deviation (RMSD) of the complexes reached an average value of ~1.25 Å (**Fig. 5a**), ~0.48 Å (**Fig. 5b**), ~0.43 Å (**Fig. 5c**), and ~0.13 Å (**Fig. 5d**), for **1-M^{pro}**, **2-M^{pro}**, **3-M^{pro}**, and **4-M^{pro}** complexes, respectively [25]. Furthermore, the RMSD graphics exhibits equilibrium trajectories with low variation around the average value (**Fig. 5**). The graphics related to other productions are depicted in **Figure S4**.

As an average value between the three productions, the IPE calculation was performed in all 250-ns MD simulations for the complexes. As can be seen in **Table 1**, the *in silico* analysis for M^{pro} showed that withanolide **1** displays a higher negative *IPE* (-128.74 kJ mol⁻¹ and standard deviation, σ , of 21.3) compared to ligands **2**, **3**, and **4**, which showed *IPE* values of -124.79 KJ.mol⁻¹ ($\sigma = 30.15$), -114.90

KJ.mol⁻¹ ($\sigma = 27.63$), and -120.39 KJ.mol⁻¹ ($\sigma = 24.53$), respectively. Based on these data, the stronger intermolecular interaction displayed for ligand **1** indicates greater antiviral activity against the SARS-CoV-2 virus. Thus, these results are outstanding for withanolides, particularly for ligand **1**, since it showed the best *in silico* activity compared to withanolide D (ligand **4**), which has been intensively investigated as an inhibitor against the two main proteases of the SARS-CoV-2, M^{pro} and Papain-Like protease (PL^{pro}) and as immunity booster [29,55,56].

The residues of M^{pro} that interact with the ligands in a radius of 5 Å were selected, and the interaction energies were acquired, as shown in **table 2**. The ligands, the selected M^{pro} residues, and the possible types of interaction are depicted in **Fig. 6**. For **1** and **4** (**Fig. 6a** and **Fig. 6c**, respectively), the emphasis was on the cysteine residue (CYS 44 and CYS 85, respectively). At the same time, there is a possible interaction between the nitrogen of the histidine and the hybridized *sp*² C28 of **2**, suggesting a possible inhibitory mechanism, even though the interaction distance is relatively large (7.81 Å), as much as the movement of the molecules during the dynamics allow an approximation that was not visualized on the last frame. For ligand **4**, possible interactions involving the catalytic dyad were evidenced: The H atom of the nitrogen inside the ring of the histidine interacts through a hydrogen bond with two oxygens of the ligand, one related to the epoxide (C4/C6) and one with hydroxyl bound to C4.

Paying regards to the energetic contribution, the most prominent residues are: GLN 189 (-12.76 kJ mol⁻¹) and ARG 217 (-20.213 kJ mol⁻¹) for **1**; ARG 188 (-23.12 kJ mol⁻¹), GLN 192 (-22.69 kJ mol⁻¹) and ALA 193 (-26.35 kJ mol⁻¹) for **2**; ARG 40 (-32.47 kJ mol⁻¹) and Met 82 (-28,57 kJ mol⁻¹) for **3**; ARG 188 (-13,02 kJ mol⁻¹), ALA 191 (-6.53 kJ mol⁻¹), GLN 189 (-15.41 kJ mol⁻¹) and GLN 192 (-15.77 kJ mol⁻¹) for **4**.

In the last frame, the only complex that presented interaction with CYS 145 and HIS 41 was the **4**, but many interactions could be lost during the simulation. An inhibitory can act in different ways, either directly, acting on the active site residues, indirectly, as an allosteric agent blocking the P₁ and the signalings pathways related to that pocket, or in a mixed way interacting with the catalytic dyad and the neighboring residues. In light of that, all the studied ligands can act as inhibitors, in a way or another, which is sustained by the stability of the compounds on the binding site and the excellent energies of interaction, based on the values for **4**, making This work a reasonable basis for further analysis on laboratories, involving *in vitro* and controlled condition simulation for evaluating the possibility of clinical trials.

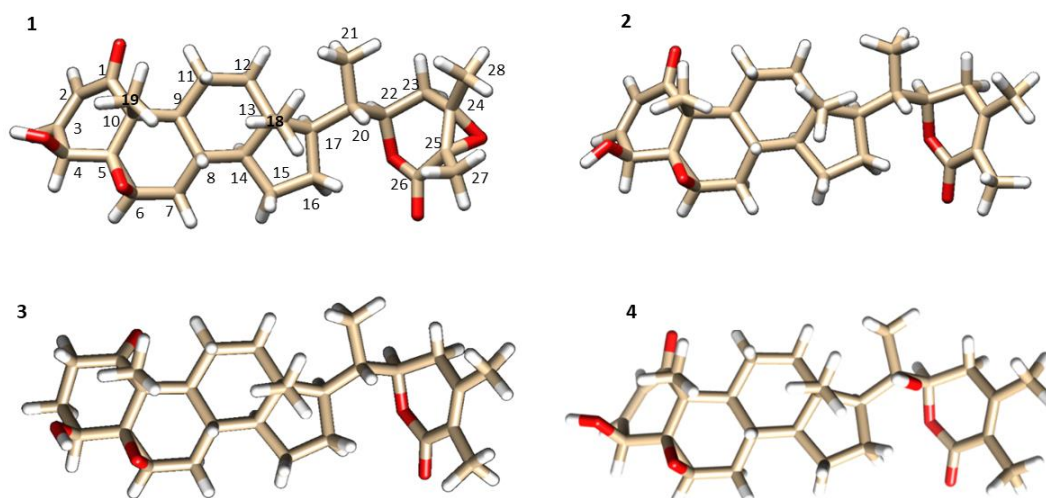


Fig. 4 Optimized structures of **1** – **4** at B3LYP/6-31G(d,p) level of theory.

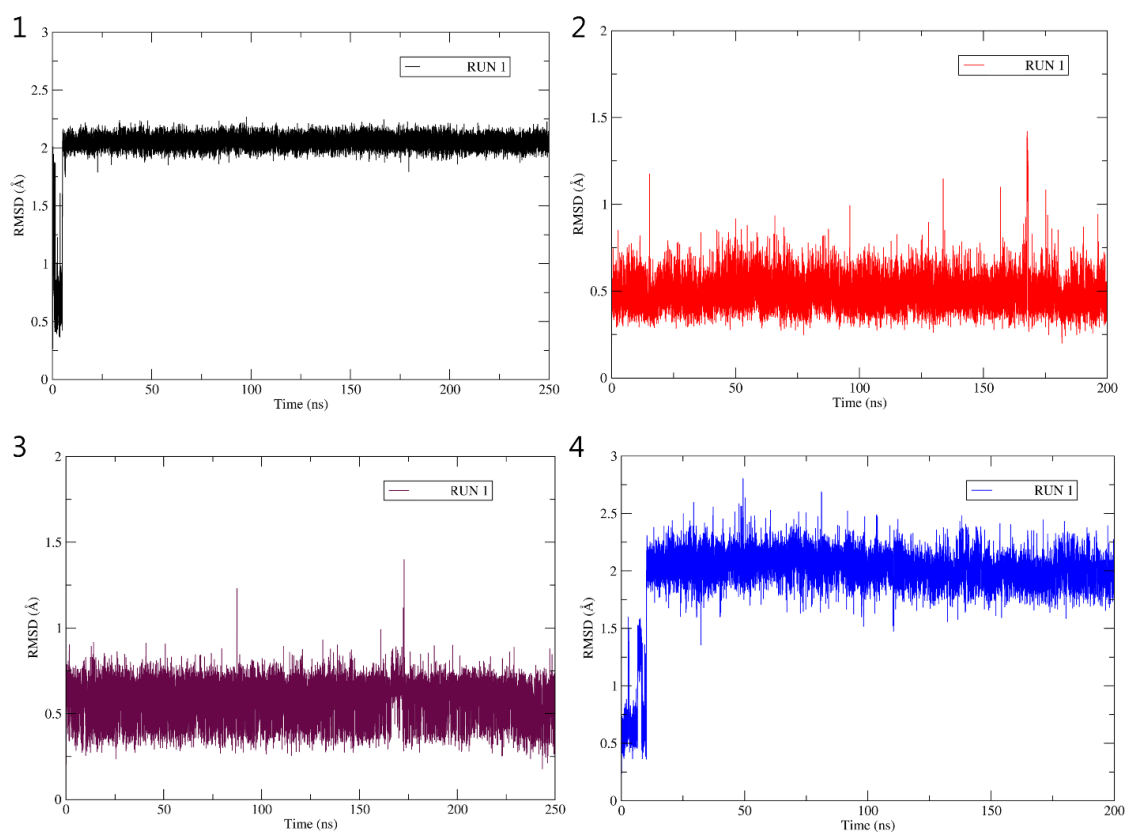


Fig. 5. Determination of RMSD between M^{PTO} and ligand **1** – **4**.

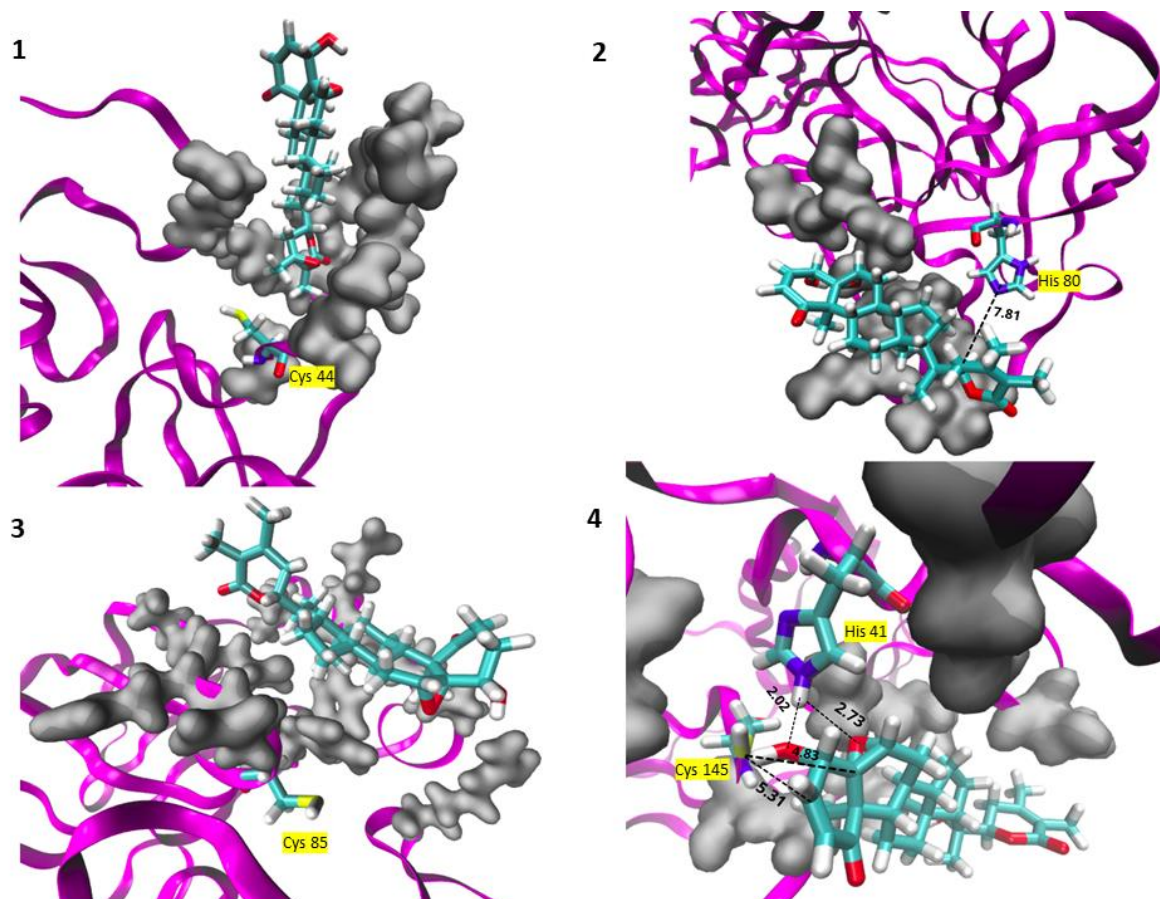


Fig. 6. Representation of M^{Pro} residues interactions with ligands 1 – 4.

Table 1 Total interaction potential energies (*IPE*) and the standard deviation (σ) between M^{Pro} and withanolides 1 – 4.

Withanolides	<i>IPE</i> (kJ mol ⁻¹)	Standard deviation (σ)
1	-128.74	21.3
2	-124.79	30.15
3	-114.90	27.63
4	-120.39	24.53

Table 2 Interaction potential energies between M^{Pro} residues and 1 – 4 ligands

1		2		3		4	
Residues	Energy (kJ mol ⁻¹)	Residues	Energy (kJ mol ⁻¹)	Residues	Energy (kJ mol ⁻¹)	Residues	Energy (kJ mol ⁻¹)
ILE43	-0.080409	TYR54	-16,1341	ARG40	-32,4782	GLN189	-15,4188
CYS44	-1.07143	GLU55	-12,1923	PRO52	-5,96348	THR190	-10,6201
THR45	-0.834308	LEU58	-9,29463	ASN53	-1,22819	GLN192	-15,7739

SER46	-6.75433	ILE59	-1,51616	TYR54	-19,901	ARG188	-13,0225
GLU47	-1.41696	HIS80	-0,6289	GLU55	-9,67852	ALA191	-6,5326
ASP48	-3.56593	MET82	-12,7903	LEU58	-8,82184	HIS41	-4,92819
MET49	-8.8839	GLN83	-4,9726	SER81	-11,818	CYS145	-2,51767
LEU50	-10.6105	ASN84	-8,97551	MET82	-28,5762	THR24	-2,13835
ASN51	-6.0956	GLN192	-22,6941	GLN83	-4,24579	THR26	-2,98361
PRO52	-15.516	ALA193	-26,3579	ASN84	-10,3484	LEU27	-1,45222
ASN53	-9.00667			CYS85	-3,88771	MET49	-2,36787
TYR54	-12.4089			ARG188	-3,26055	LEU50	-2,5468
LEU57	-0.522052						
ARG188	-12.5477						
GLN189	-12.7686						
ARG217	-20.213						
ILE213	-12.3765						

4 Conclusion

Since the new coronavirus pandemic, studies involving natural products have been carried out to find possible anti-SARS-CoV-2 agents. In this context, the withanolides appear as promising inhibitors of the SARS-CoV-2 coronavirus. The *in silico* molecular docking and MD studies of three withanolides, not yet investigated on the SARS-CoV-2 coronavirus, corroborate the antiviral potential of this large class of compounds. Furthermore, based on the overall interaction energies and the RMSD, this work points to the studied withanolides as suitable inhibitors against the M^{pro}, showing stability and good affinity, principally compared to the data of the chosen reference inhibitor withanolide D, presenting better results.

Declarations

Supplementary Information The online version contains supplementary material.

Funding: This study was financed by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - INCT BioNat (No. 465637/2014-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Nº. 420454/2016-0, Nº. 10183/2020-0, and Nº. 140562/2019-2).

Conflicts of interest: The authors declare no competing or financial interest.

Ethics approval: This study does not require ethics approval.

Consent to participate: The authors approve the participation in the paper.

Consent for publication: The authors agree with the publication of the paper.

Data availability The datasets used and/or analyzed during the current study is freely available

Code availability The software used during this study is freely available and is also available from the corresponding author on reasonable request.

Author Contributions

Késya Amanda D. Rocha: performed the isolation and characterization of compounds and writing the original paper

Pablo Abreu Alves and Lucas Lima Bezerra: performed the computational studies and writing the original paper
Alejandro Pedro Ayala: performed the x-ray crystallographic analyses

Otília Deusdênia Loiola Pessoa and Norberto de Kássio Vieira Monteiro: supervision, conceptualization, revised and editing the paper.

Acknowledgments

The authors thank High-Performance Computing Center (NPAD) at Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) and the National High-Performance Processing Center of the Federal University of Ceará (UFC) for providing computational resources.

References

1. Christopher T, (2021) Just how do deaths due to covid-19 stack up? Think global health. In: Think global health. <https://www.thinkglobalhealth.org/article/just-how-do-deaths-due-covid-19-stack>. Accessed 12 Jun 2022
2. Kemel A, Natalia SA, Alessio L, *et al* (2021) Mechanism of inhibition of SARS-CoV-2 Mpro by N3 peptidyl michael acceptor explained by QM/MM simulations and design of new derivatives with tunable chemical reactivity kemel. *Chem Sci* 9:1–25. <https://doi.org/10.1039/D0SC06195F>
3. Ampornanai K, Meng X, Shang W, *et al* (2021) Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives. *Nat Commun* 12:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23313-7>
4. Lan J, Ge J, Yu J, *et al* (2020) Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 581:215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
5. López OC, Overall CM (2002) Protease degradomics: A new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:509–519. <https://doi.org/10.1038/nrm858>
6. Turk B (2006) Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5:785–799. <https://doi.org/10.1038/nrd2092>
7. Alberto AVP, Ferreira NCF, Soares RF, *et al* (2020) Molecular modeling applied to the discovery of new lead compounds for P2 receptors based on natural sources. *Front Pharmacol* 11:01221. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01221>
8. Wijeratne EMK, Oliveira MCF, Mafezoli J, *et al* (2018) Withaferin A and withanolide D analogues with dual heat-shock-inducing and cytotoxic activities: Semisynthesis and biological evaluation. *J Nat Prod* 81:825–837. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00918>
9. Nguyen DD, Gao K, Chen J, *et al* (2020) Unveiling the molecular mechanism of SARS-CoV-2 main protease inhibition from 137 crystal structures using algebraic topology and deep learning. *Chem Sci* 11:12036–12046. <https://doi.org/10.1039/d0sc04641h>
10. Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod* 79:629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
11. Newman DJ, Cragg GM (2020) Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod* 83:770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
12. Cao CM, Wu X, Kindscher K, *et al* (2015) Withanolides and Sucrose Esters from *Physalis neomexicana*. *J Nat Prod* 78:2488–2493. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00698>
13. Xu YM, Bunting DP, Liu MX, *et al* (2016) 17 β -Hydroxy-18-acetoxywithanolides from Aeroponically

- Grown *Physalis crassifolia* and Their Potent and Selective Cytotoxicity for Prostate Cancer Cells. *J Nat Prod* 79:821–830. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00911>
14. Llanos GG, Araujo LM, Jiménez IA, *et al* (2017) Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of withaferin A-analogues as potent apoptotic inducers. *J Med Chem* 140:52–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.004>
 15. Abdeljebbar LH, Benjouad A, Morjani H, *et al* (2009) Antiproliferative Effects of Withanolides from *Withania adpressa*. *Therapie* 64:121–127. <https://doi.org/10.2515/therapie/2009015>
 16. Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Sairam K, *et al* (2000) Anxiolytic-antidepressant activity of *Withania somnifera* glycowithanolides: an experimental study. *Phytomedicine* 7:463–469. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80030-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80030-6)
 17. Budhiraja RD, Krishan, Sudhir S (2000) Biological Activity of Withanolides. *J Sci Ind Res (India)* 59:904–911
 18. Shohat B, Joshua H (1971) Effect of withaferin A on ehrlich ascites tumor cells. II. Target tumor cell destruction in vivo by immune activation. *Int J cancer* 8:487–496. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910080317>
 19. Baitharu I, Jain V, Deep SN, *et al* (2014) Withanolide A prevents neurodegeneration by modulating hippocampal glutathione biosynthesis during hypoxia. *PLoS One* 13;9(10):105311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105311>
 20. White PT, Subramanian C, Motiwala HF, *et al* (2016) Natural withanolides in the treatment of chronic diseases. *Adv Exp Med Biol*, 928:329–373.
 21. Yang Y, Xiang K, Sun D, *et al* (2021) Withanolides from dietary tomatillo suppress HT1080 cancer cell growth by targeting mutant IDH1. *Bioorg Med Chem* 36:116095. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116095>
 22. Ballesteros VD, Alvarez RG, León C, *et al* (2019) Anti-proliferative bioactivity against HT-29 colon cancer cells of a withanolides-rich extract from golden berry (*Physalis peruviana* L.) calyx investigated by Foodomics. *J Funct Foods* 63:103567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103567>
 23. Baig MW, Nasir B, Waseem D, *et al* (2020) Withametelin: a biologically active withanolide in cancer, inflammation, pain and depression. *Saudi Pharm J* 28:1526–1537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.09.021>
 24. Khanal P, Chikhale R, Dey YN, *et al* (2021) Withanolides from *Withania somnifera* as an immunity booster and their therapeutic options against COVID-19. *J Biomol Struct Dyn* 18:1–14. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1869588>
 25. Patel CN, Kumar SP, Pandya HA, *et al* (2021) Identification of potential inhibitors of coronavirus hemagglutinin-esterase using molecular docking, molecular dynamics simulation and binding free energy calculation. *Mol Divers* 25:421–433. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10135-w>
 26. Gurung AB, Ali MA, Lee J, *et al* (2022) Molecular modelling studies unveil potential binding sites on human serum albumin for selected experimental and in silico COVID-19 drug candidate molecules. *Saudi J Biol Sci* 29:53–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.09.042>
 27. Bitencourt FG, Azevedo WF (2019) Docking with SwissDock. *Methods Mol Biol* 2053:189–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9752-7_12
 28. Roy K, Kar S, Das RN (2015) Understanding the basics of QSAR for applications in pharmaceutical sciences and risk assessment. Academic Press, Boston, pp 357–425
 29. Erickson JA, Jalaie M, Robertson DH, *et al* (2004) Lessons in molecular recognition: The effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. *J Med Chem* 47:45–55. <https://doi.org/10.1021/jm030209y>
 30. Salmaso V, Moro S (2018) Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Front Pharmacol* 9:1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
 31. Bruker (2018) APEX III. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA
 32. Bruker (2018) Bruker SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA
 33. Sheldrick, GM (1996) SADABS, Program for area detector adsorption correction. Institute for Inorganic Chemistry, University of Gottingen, Germany
 34. Sheldrick GM (2015) SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Cryst A* 71, 3–8
 35. Sheldrick GM (2015) Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Cryst C* 71, 3–8
 36. Petukh M, Stefl S, Alexov E (2013) The role of protonation states in ligand-receptor recognition and binding. *Curr Pharm Des* 19:4182–4190. <https://doi.org/10.2174/1381612811319230004>
 37. Kurtzman N (1989) Physiology of acid-base balance. Springer Sci Media New York 19–22:263–264
 38. Hoover WG (1985) Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev A Gen Phys* 31(3):1695–1697. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695>

39. Vosko SH, Wilk L, Nusair M (1980) Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can J Phys* 59:1200. <https://doi.org/10.1139/p80-159>
40. Lee C, Yang W, Parr RG (1988) Development of the colle-salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 37:785–789. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>
41. Petersson GA, Bennett A, Tensfeldt TG, *et al* (1988) A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. *Chem Phys* 89:2193. <https://doi.org/10.1063/1.455064>
42. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, *et al* (2009) Gaussian 9. Gaussian Inc., Wallingford CT
43. Mengist HM, Dilnessa T, Jin T (2021) Structural basis of potential inhibitors targeting SARS-CoV-2 main protease. *Front Chem* 9:622898. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0349.v1>
44. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, *et al* (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
45. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, *et al* (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30(16):2785-91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
46. Holt PA, Chaires JB, Trent JO (2008) Molecular docking of intercalators and groove-binders to nucleic acids using Autodock and Surflex. *J Chem Inf Model* 48:1602–1615. <https://doi.org/10.1021/ci800063v>
47. Gao K, Wang R, Chen J, *et al* (2022) Methodology-centered review of molecular modeling, simulation, and prediction of SARS-CoV-2. *Chem Rev*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00965>
48. Trott AJO (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J Comput Chem* 31:455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
49. Holanda VN, Silva WV, Nascimento PH, *et al* (2020) Antileishmanial activity of 4-phenyl-1-[2-(phthalimido-2-yl)ethyl]-1H-1,2,3-triazole (PT4) derivative on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*: In silico ADMET, in vitro activity, docking and molecular dynamic simulations. *Bioorg Chem* 105:104437. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104437>
50. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, *et al* (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
51. Cui W, Yang K, Yang H (2020) Recent progress in the drug development targeting SARS-CoV-2 Main Protease as treatment for COVID-19. *Front Mol Biosci* 7:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.616341>
52. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, *et al* (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
53. Feller SE, MacKerell AD (2000) An improved empirical potential energy function for molecular simulations of phospholipids. *J Phys Chem B* 104:7510–7515. <https://doi.org/10.1021/jp0007843>
54. Klauda JB, Brooks BR, MacKerell AD, *et al* (2005) An ab initio study on the torsional surface of alkanes and its effect on molecular simulations of alkanes and a DPPC bilayer. *J Phys Chem B* 109:5300–5311. <https://doi.org/10.1021/jp0468096>
55. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, *et al* (2011) SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem* 32(11):2359-68. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
56. Mark P, Nilsson L (2001) Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. *J Phys Chem A* 105:9954–9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>
57. Arfken GB, Weber HJ, Harris FE (2013) *Mathematical methods for physicists* (seventh edition). Academic Press, Boston
58. Sarkar I, Goswami S (2018) Computational methodologies followed in structure based in-silico drug design: An example. *Lect Notes Networks Syst* 11:569–574. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3953-9_55
59. Shewchuk JR (1994) *An Introduction to the conjugate gradient method without the agonizing pain*. Carnegie Mellon University, USA
60. Bussi G, Donadio D, Parrinello M (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J Chem Phys* 126:014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
61. Nosé S, Klein ML (1983) Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. *Mol Phys* 50(5):1055–1076. <https://doi.org/10.1080/00268978300102851>
62. Hoover, WG (1985) Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev A* 31(3):1695–1697. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.31.1695>
63. Amorim CB, Daniele SA, Parente AMS, *et al* (2019) Potent and broad-spectrum antimicrobial activity of analogs from the scorpion peptide stigmurin. *Int J Mol Sci* 31;20(3):623. <https://doi.org/10.3390/ijms20030623>
64. Bleicher KH, Böhm HJ, Müller K, *et al* (2003) Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2:369–378. <https://doi.org/10.1038/nrd1086>

65. Ramírez D, Caballero J (2016) Is it reliable to use common molecular docking methods for comparing the binding affinities of enantiomer pairs for their protein target?. *Int J Mol Sci* 20;17(4):525. <https://doi.org/10.3390/ijms17040525>
66. Eargle J, Wright D, Luthey SZ (2006) Multiple Alignment of protein structures and sequences for VMD. *Bioinformatics* 22:504–506. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti825>
67. Stone J, Gullingsrud J, Grayson P, *et al* (2001) A system for interactive molecular dynamics simulation. In: Hughes JF, Séquin CH (eds) *ACM symposium on interactive 3D graphics, ACM SIGGRAPH*. New York, pp 191–194
68. Sharma R, *et al* (1996) Speech/gesture interface to a visual computing environment for molecular biologists. *IEEE* 3:964-968. <https://doi.org/10.1109/ICPR.1996.547311>
69. Kirsona, Glottera E, Abrahamb DL (1970) Constituents of *Withania somnifera* dun—XI : The structure of three new withanolides. *Tetrahedron* 26:2209–2219. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)92800-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)92800-5)
70. Yoneyama T, Arai MA, Sadhu SK, *et al* (2015) Hedgehog inhibitors from *Withania somnifera*. *Bioorg Med Chem Lett* 25:3541–3544. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.081>
71. Roy K, Sengupta C, De AU (2001) Theoretical aspects of rational drug design - An overview. Lambert Academic Publishing, Chisinau (Republic of Moldova)
72. Namba AM, Da Silva VB, Da Silva CHTP (2008) Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclet Quim* 33:13–24. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702008000400002>
73. Parida PK, Paul D, Chakravorty D (2020) The natural way forward: Molecular dynamics simulation analysis of phytochemicals from Indian medicinal plants as potential inhibitors of SARS-CoV-2 targets. *Phyther Res* 34:3420–3433. <https://doi.org/10.1002/ptr.6868>
74. Tripathi MK, Singh P, Sharma S, *et al* (2020) Identification of bioactive molecule from *Withania somnifera* (Ashwagandha) as SARS-CoV-2 main protease inhibitor. *J Biomol Struct Dyn* 0:1–14. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1790425>
75. Dhawan M, Parmar M, Sharun K, *et al* (2021) Medicinal and therapeutic potential of withanolides from *Withania somnifera* against COVID-19. *J Appl Pharm Sci* 11:006–013. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110402>
76. Khanal P, Chikhale R, Dey YN, *et al* (2020) Withanolides from *Withania somnifera* as an immunity booster and their therapeutic options against COVID-19. *J Biomol Struct Dyn* 0:1–14. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1869588>

REFERÊNCIAS

- ABDELJEBBAR L.H.; BENJOUAD A.; MORJANI H. *et al.* Antiproliferative effects of Withanolides from *Withania adpressa*. **Thérapie**, v. 64, p. 121–127, 2009.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015.
- ADHIKARI, B. *et al.* Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: A review. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1298–1312, 2021.
- AHMED, H. U. *et al.* The determination of protonation states in proteins. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 63, n. Pt 8, p. 906–922, ago. 2007.
- ARFKEN, G. B.; WEBER, H. J.; HARRIS, F. E. (EDS.). Preface. In: *Mathematical Methods for Physicists (Seventh Edition)*. 7. ed. Boston: **Academic Press**, 2013. p. xi–xiii.
- BAITHARU, I. *et al.* Withanolide A prevents neurodegeneration by modulating hippocampal glutathione biosynthesis during hypoxia. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e105311, 2014.
- BHATTACHARYA, S. K. *et al.* Anxiolytic-antidepressant activity of *Withania somnifera* glycowithanolides: an experimental study. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 463–469, dez. 2000.
- BITENCOURT-FERREIRA, G.; DE AZEVEDO, W. F. Jr. Docking with SwissDock. **Methods Mol Biol**, v. 2053, p. 189–202, 2019 doi: 10.1007/978-1-4939-9752-7_12. PMID: 31452106.
- BOOPATHI, S.; POMA, A. B.; KOLANDAIVEL, P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2020.
- BRANT, A. C. *et al.* SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. **Cell & Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 136, 2021.
- BUDHIRAJA, R.; KRISHAN, P.; SUDHIR, S. Biological Activity of Withanolides. **Journal of Scientific and Industrial Research (JSIR)**, v. 59, n. 11, p. 904–911, 2000.
- HOOVER, W. G. Canonical Dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical review. A, General physics**, v. 31,3, p. 1695–1697, 1985
- CHENG, X.; IVANOV, I. Molecular dynamics. **Methods in Molecular Biology**, v. 929, p. 243–285, 2012.
- DE AZEVEDO JR., W.; DIAS, R. Computational methods for calculation of ligand-binding affinity. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 1031–1039, 2008.
- DE WIT, E. *et al.* SARS and MERS: Recent insights into emerging coronaviruses. **Nature**

Reviews Microbiology, v. 14, n. 8, p. 523–534, 2016.

DHANJAL, J. K. *et al.* Molecular mechanism of anti-SARS-CoV2 activity of Ashwagandha-derived withanolides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 297–312, 2021.

DHAR, N. *et al.* A decade of molecular understanding of withanolide biosynthesis and in vitro studies in *Withania somnifera*(L.) dunal: Prospects and perspectives for pathway engineering. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1–20, 2015.

DHAWAN, M. *et al.* Medicinal and therapeutic potential of withanolides from *Withania somnifera* against COVID-19. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 11, n. 4, p. 006–013, 2021.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2,2, p. 303-36, 2012.

ERICKSON, J. A. *et al.* Lessons in molecular recognition: The effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 45–55, 2004.

FEHÉR, M.; VESZPRÉMI, T. Quantum Chemistry: Fundamentals to Applications. 1. ed. New York: **Springer New York**, 1999.

FELLER, S. E.; MACKERELL, A. D. An Improved Empirical Potential Energy Function for Molecular Simulations of Phospholipids. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 31, p. 7510–7515, 2000.

FORMATO, G. M., SCHIEVANO, S., BIGLINO, G. (2022). Overview of computational methods BT - Modelling congenital heart disease: engineering a patient-specific therapy. [s.l]: **Springer International Publishing**, 2022.

FRISCH, M. J., *et al.* Gaussian 9. Wallingford: **Gaussian, Inc**, 2009.

GAROFALO, M. *et al.* How computational chemistry and drug delivery techniques can support the development of new anticancer drugs. **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020.

GHOSH, A. *et al.* Structure-activity relationship (SAR) and molecular dynamics study of withaferin-A fragment derivatives as potential therapeutic lead against main protease (Mpro) of SARS-CoV-2. **Journal of Molecular Modeling**, v. 27, n. 3, 2021.

GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; AGGARWAL, B. B. (Eds.). Anti-inflammatory nutraceuticals and chronic diseases. New York: **Springer**, 2016.

HATADA, R. *et al.* Fragment molecular orbital based interaction analyses on COVID-19 main protease – Inhibitor N3 complex (PDB ID: 6LU7). **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 7, p. 3593–3602, 2020.

HOLT, P. A.; CHAIRES, J. B.; TRENT, J. O. Molecular docking of intercalators and Groove-Binders to nucleic acids using Autodock and Surflex. **Journal of Chemical Information and**

Modeling, v. 48, n. 8, p. 1602–1615, 2008.

HONG, J. Natural product synthesis at the interface of chemistry and biology. **Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 20, n. 33, p. 10204–10212, 2014.

KALRA, R. S. *et al.* COVID19-inhibitory activity of withanolides involves targeting of the host cell surface receptor ACE2: insights from computational and biochemical assays. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, p. 1–14, 2021.

KHANAL, P. *et al.* Withanolides from *Withania somnifera* as an immunity booster and their therapeutic options against COVID-19. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–14, 18 jan. 2021.

KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KOONIN, E. V.; KRUPOVIC, M.; AGOL, V. I. The Baltimore classification of viruses 50 years later: How does it stand in the light of virus evolution? **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 3, 2021.

KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Methods of protein structure comparison. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 857, p. 231–257, 2012.

KUMAR, Y.; SINGH, H.; PATEL, C.N. In silico prediction of potential inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2 using molecular docking and dynamics simulation based drug-repurposing. **J Infect Public Health**, v. 13(9), p. 1210-1223, 2020

MACKERELL, A. D. J.; BANAVALI, N.; FOLOPPE, N. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. **Biopolymers**, v. 56, n. 4, p. 257–265, [*s.d.*].

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 2001.

MENG, X.Y. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MONTICELLI, L.; TIELEMAN, D. P. Force fields for classical molecular dynamics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 924, p. 197–213, 2013.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Quimica**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NATURE. All natural. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 351, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NOSÉ, S.; KLEIN, M. L. Constant pressure molecular dynamics for molecular systems. **Molecular Physics**, v. 50, n. 5, p. 1055–1076, 1983.

O'ROURKE, K. F.; GORMAN, S. D.; BOEHR, D. D. Biophysical and computational methods to analyze amino acid interaction networks in proteins. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 245–251, 2016.

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

PALERMO, G.; DE VIVO, M. Computational chemistry for drug discovery. In: Bhushan, B. (eds). Dordrecht: **Springer - Encyclopedia of Nanotechnology**, 2015.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_100975-1

PARK, H.; LEE, H.; SEOK, C. High-resolution protein–protein docking by global optimization: recent advances and future challenges. **Current opinion in structural Biology**, v. 35, p. 24–31, 2015.

PARVATHANENI, V.; GUPTA, V. Utilizing drug repurposing against COVID-19 - Efficacy, limitations, and challenges. **Life Sciences**, v. 59, p. 118-275, 2020.

PAYNE, S. Introduction to RNA viruses. **Viruses**, p. 97–105, 2017.

PETERSSON, G. A. *et al.* A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. **J. Chem. Phys.**, v. 89, n. 4, p. 2193–2218, 1988.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PONDER, J. W.; CASE, D. A. Force fields for protein simulations. **Advances in protein chemistry**, v. 66, p. 27–85, 2003.

ROMANO, J. D.; TATONETTI, N. P. Informatics and computational methods in natural product drug discovery: A review and perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1–16, 2019.

RUDDEN, L. S. P.; DEGIACOMI, M. T. Protein docking using a single representation for protein surface, electrostatics, and local dynamics. **Journal of chemical theory and computation**, v. 15, n. 9, p. 5135–5143, 2019.

SARTORI, G. R.; NASCIMENTO, A. S. Comparative analysis of electrostatic models for ligand docking. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, 2019.

SHANG, J. *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 21, 2020.

SHEWCHUK, J. R. An introduction to the conjugate gradient method without the agonizing pain. USA: **Carnegie Mellon University**, 1994.

SHOHAT, B.; JOSHUA, H. Effect of withaferin A on ehrlich ascites tumor cells. II. Target tumor cell destruction in vivo by immune activation. **International journal of cancer**, v. 8,

n. 3, p. 487–496, nov. 1971.

SHREE, P. *et al.* Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytochemicals of ayurvedic medicinal plants - *Withania somnifera* (Ashwagandha), *Tinospora cordifolia* (Giloy) and *Ocimum sanctum* (Tulsi) - a molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 1, p. 190–203, 2022.

SILVA, J. C. A. *et al.* Investigation of the structural dynamics of a knotted protein and its unknotted analog using molecular dynamics. **Journal of Molecular Modeling**, v. 28, n. 4, p. 108, 2022.

SILVA, R. C. *et al.* Natural products-based drug design against SARS-CoV-2 Mpro 3CLpro. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, p. 11739, 2021.

SINGH, A.; PANDEY, A. K.; DUBEY, S. K. Genome sequencing and in silico analysis of isoprene degrading monooxygenase enzymes of *Sphingobium* sp. BHU LFT2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–14, 2022.

SLIWOSKI, G. *et al.* Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 2013.

TOMONARI, M. *et al.* SARS-CoV 3CL protease cleaves its C-terminal autoprocessing site by novel subsite cooperativity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 46, p. 12997–13002, 2016.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, 2009.

WU, G. *et al.* Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm. **Journal of computational chemistry**, v. 24, n. 13, p. 1549–1562, 2003.

YANG, L. *et al.* High-throughput methods in the discovery and study of biomaterials and materiobiology. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 8, p. 4561–4677, 2021a.

YANG, Y. *et al.* Withanolides from dietary tomatillo suppress HT1080 cancer cell growth by targeting mutant IDH1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 116095, 2021b.

ANEXO A - SUPPLEMENTARY INFORMATION

Withanolides of *Athenaea velutina* with potential inhibitory properties against SARS coronavirus main protease (M^{pro}): Molecular modeling studies

Pablo Abreu Alves^{a,b}, Késya Amanda D. Rocha^b, Lucas Lima Bezerra^a, Norberto de Kássio Vieira Monteiro^{a*}, Alejandro Pedro Ayala^b, Otília Deusdênia Loiola Pessoa^{c*}

^a Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, 60461-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^b Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, 60.440-970, Fortaleza-CE, Brazil

^c Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60.021-970, Fortaleza-CE, Brazil

* Corresponding authors. E-mail: opessoa@ufc.br

Electronic Supplementary Information (ESI) available: Marvin was used for drawing, displaying, and characterizing chemical structures, substructures, and reactions, Marvin Suite version 20.13.0 from 2020, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

Contents

Figure S1. Major state of microspecies distribution of 1 – 4.	65
Figure S2. Representation of the interactions between the four ligands studied and the SARS-CoV-2 main protease.	65
Figure S3. The 2D binding sites diagram of 1, 2, 3 and 4 with M ^{pro} target.	66
Figure S4. Determination of RMSD of the other production between M ^{pro} and ligands 1 – 4.	67
Figure S5. FTIR spectrum of 1.	68
Figure S6. ¹ H NMR (300.13 MHz) spectrum of 1, in CDCl ₃	69
Figure S7. ¹³ C NMR (75.47 MHz) spectrum of 1, in CDCl ₃	69
Figure S8. DEPT 135° NMR (75.47 MHz) spectrum of 1, in CDCl ₃	70
Figure S9. HSQC NMR spectrum of 1, in CDCl ₃	71
Figure S10. COSY NMR spectrum of 1, in CDCl ₃	72
Figure S11. HMBC NMR spectrum of 1, in CDCl ₃	73
Figure S12. HMBC NMR spectrum of 1, in CDCl ₃	74
Figure S13. NOESY NMR spectrum of 1, in CDCl ₃	75
Figure S14. HRESIMS spectrum of 1.	76
Figure S15. FTIR spectrum of 2.	77
Figure S16. ¹ H NMR (500.13 MHz) spectrum of 2, in CDCl ₃	78
Figure S17. ¹³ C NMR (125.75 MHz) spectrum of 2, in CDCl ₃	79
Figure S18. FTIR spectrum of 3.	80
Figure S19. ¹ H NMR (300.13 MHz) spectrum of 3, in CDCl ₃	80
Figure S20. ¹³ C NMR (75.47 MHz) spectrum of 3, in CDCl ₃	81

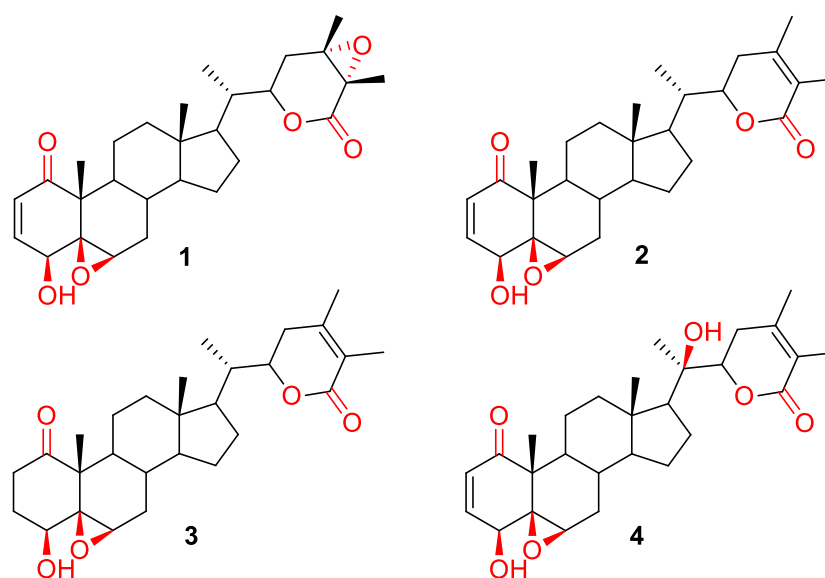


Figure S1. Major state of microspecies distribution of 1 – 4.

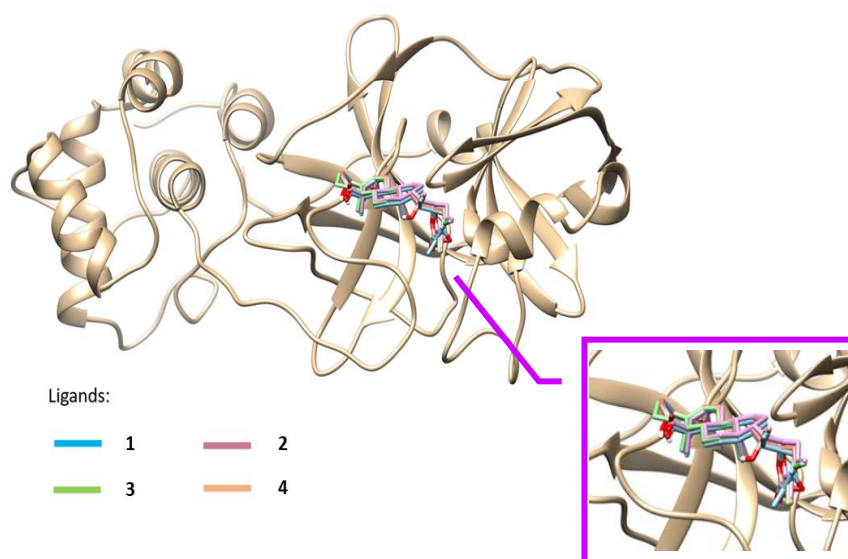


Figure S2. Representation of the interactions between the four ligands studied and the SARS-CoV-2 main protease

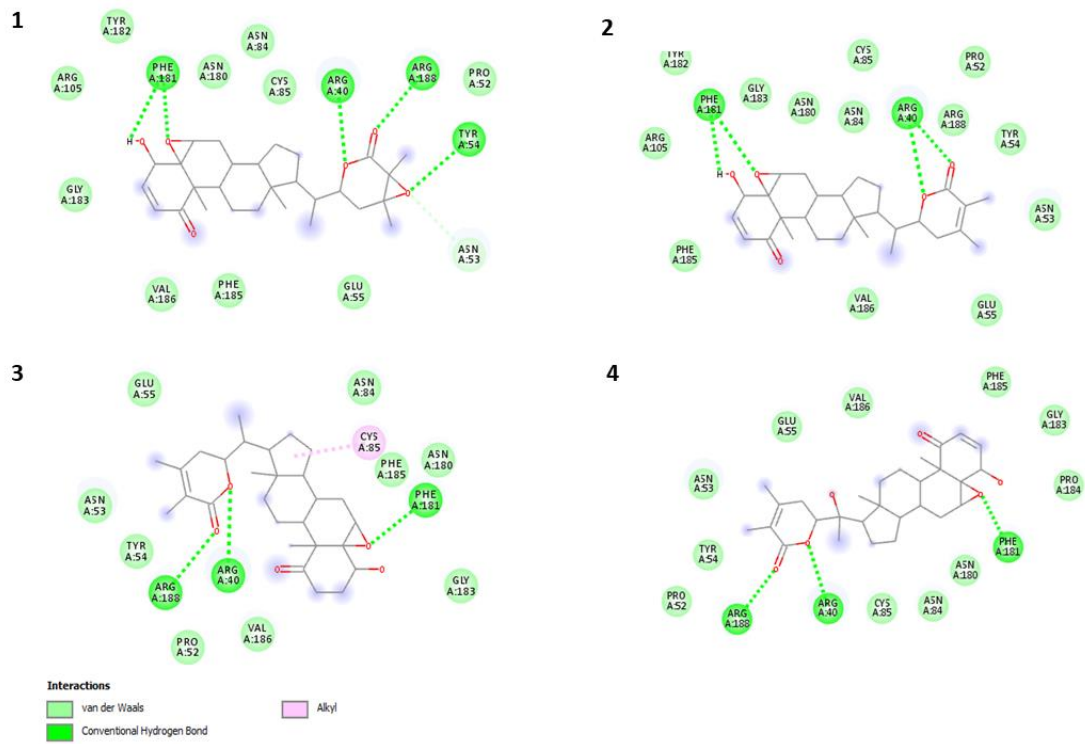


Figure S3. The 2D binding sites diagram of 1 – 4 with M^{pro} target.

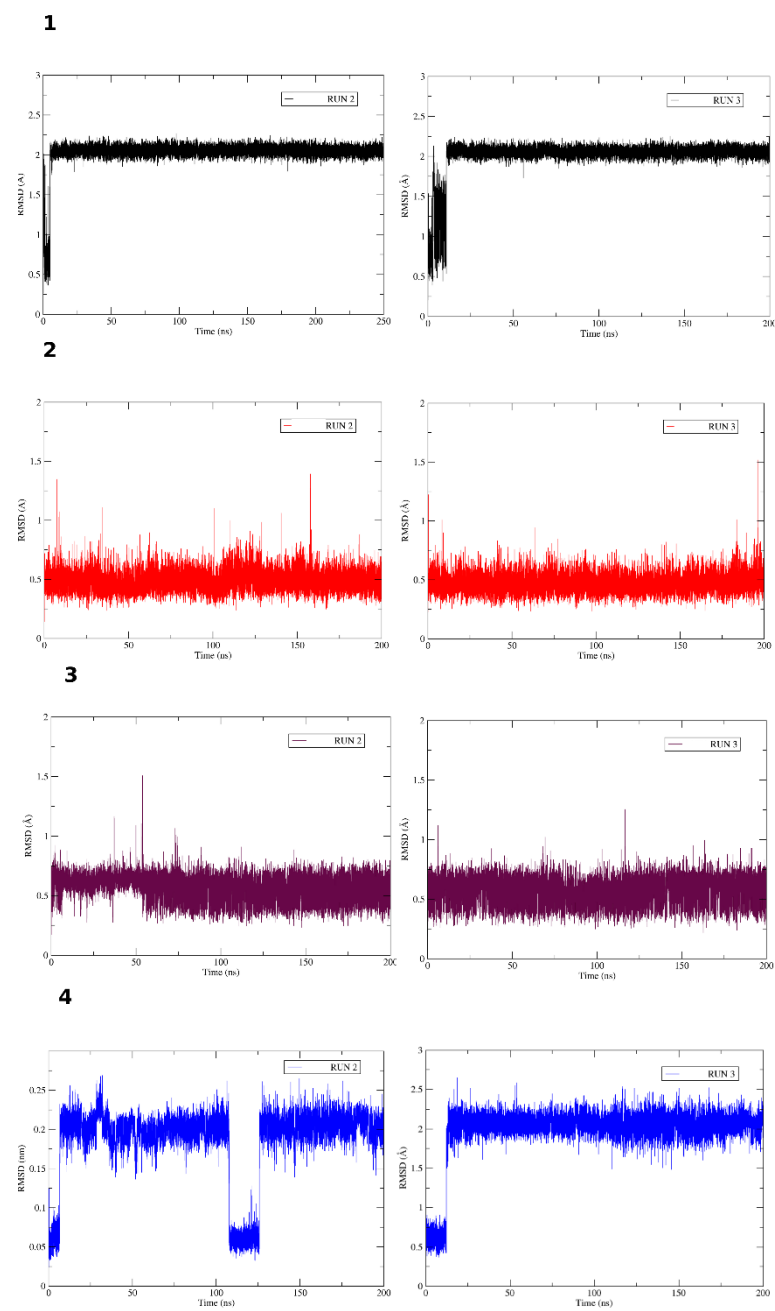


Figure S4. Determination of RMSD of the other production between M^{PTO} and ligands 1 – 4.

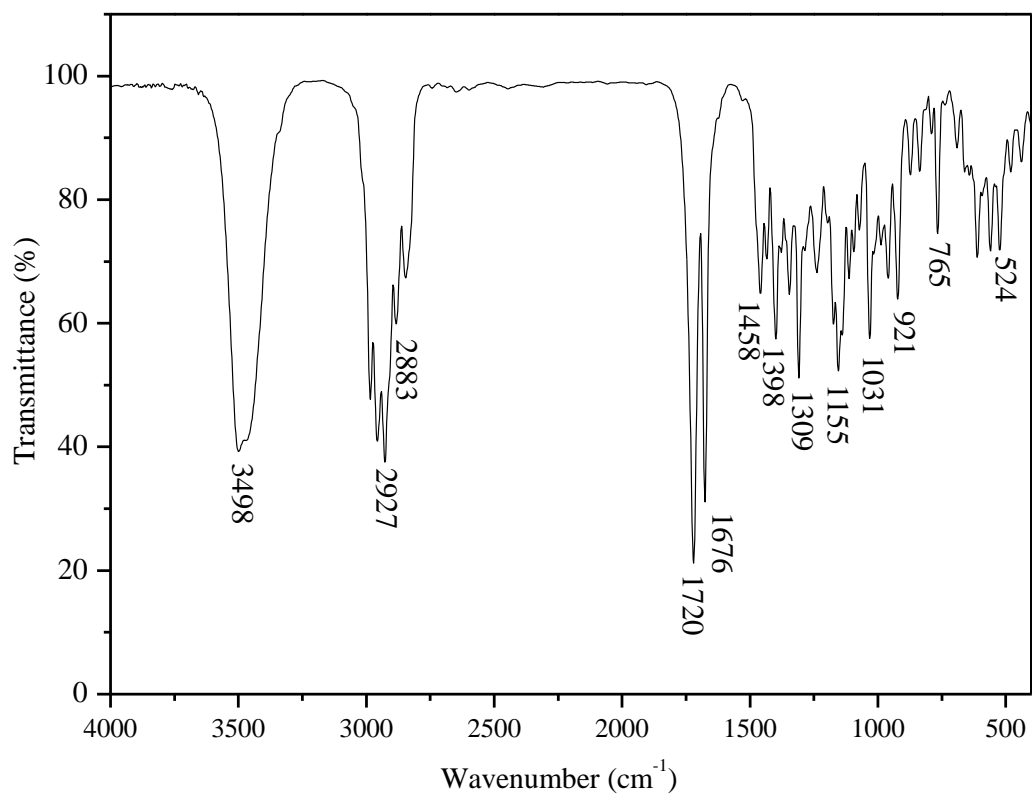


Figure S5. FTIR spectrum of **1**.

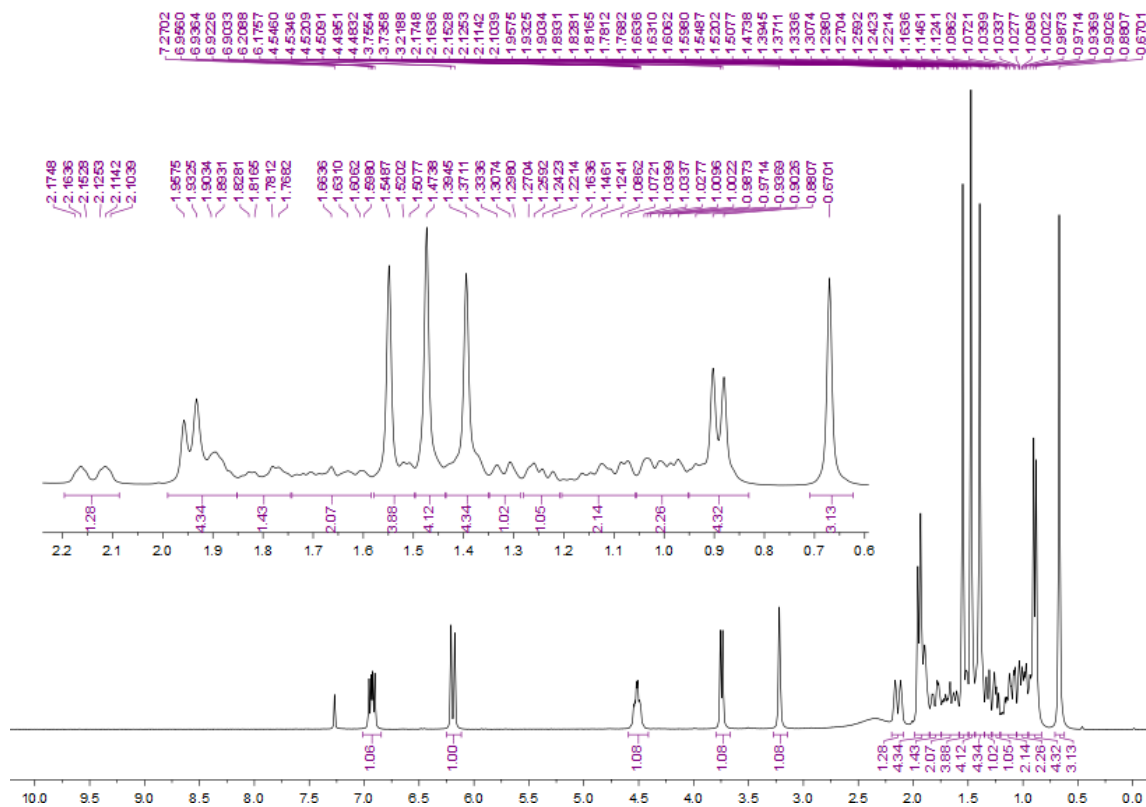


Figure S6. ^1H NMR (300.13 MHz) spectrum of **1**, in CDCl_3 .

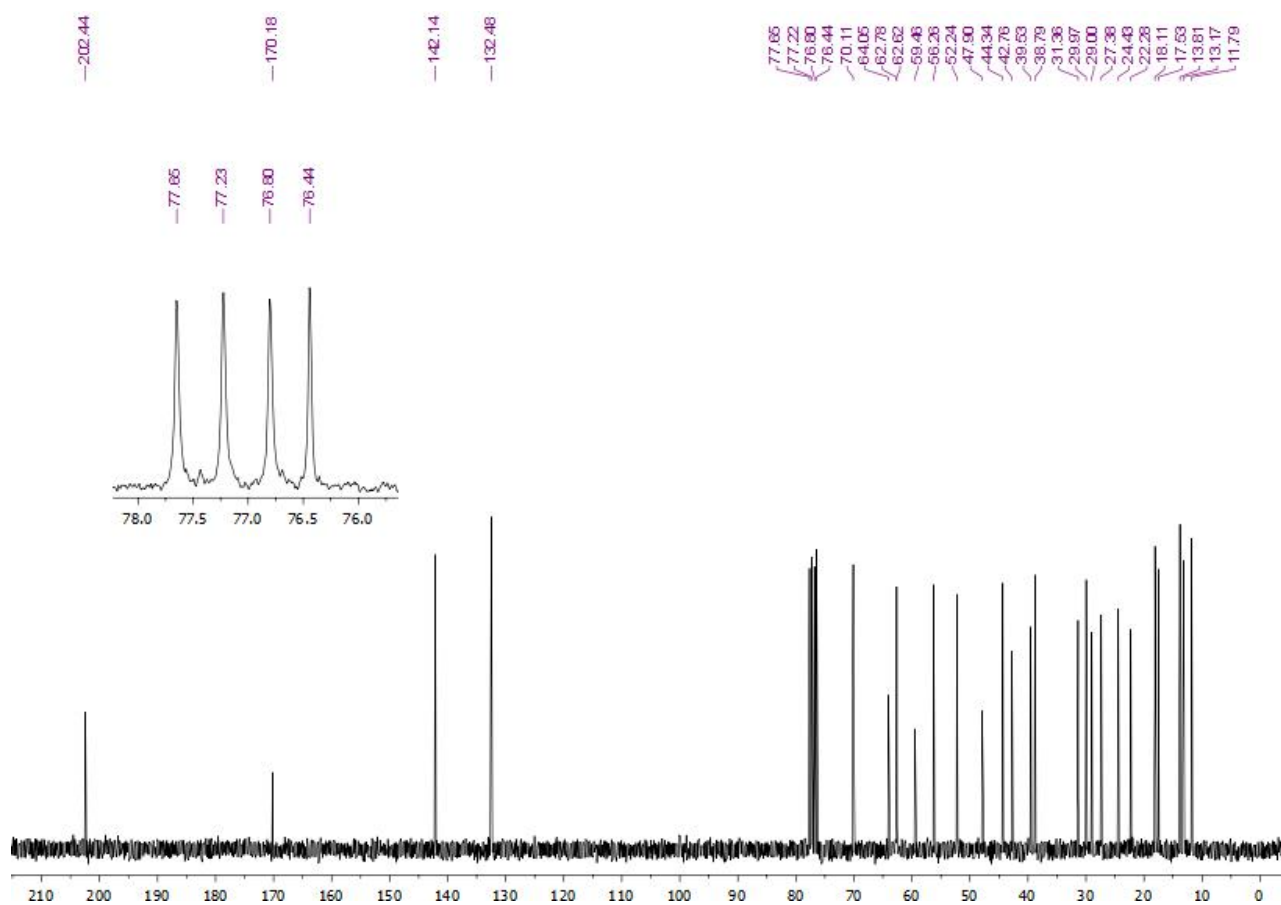


Figure S7. ^{13}C NMR (75.47 MHz) spectrum of **1**, in CDCl_3 .

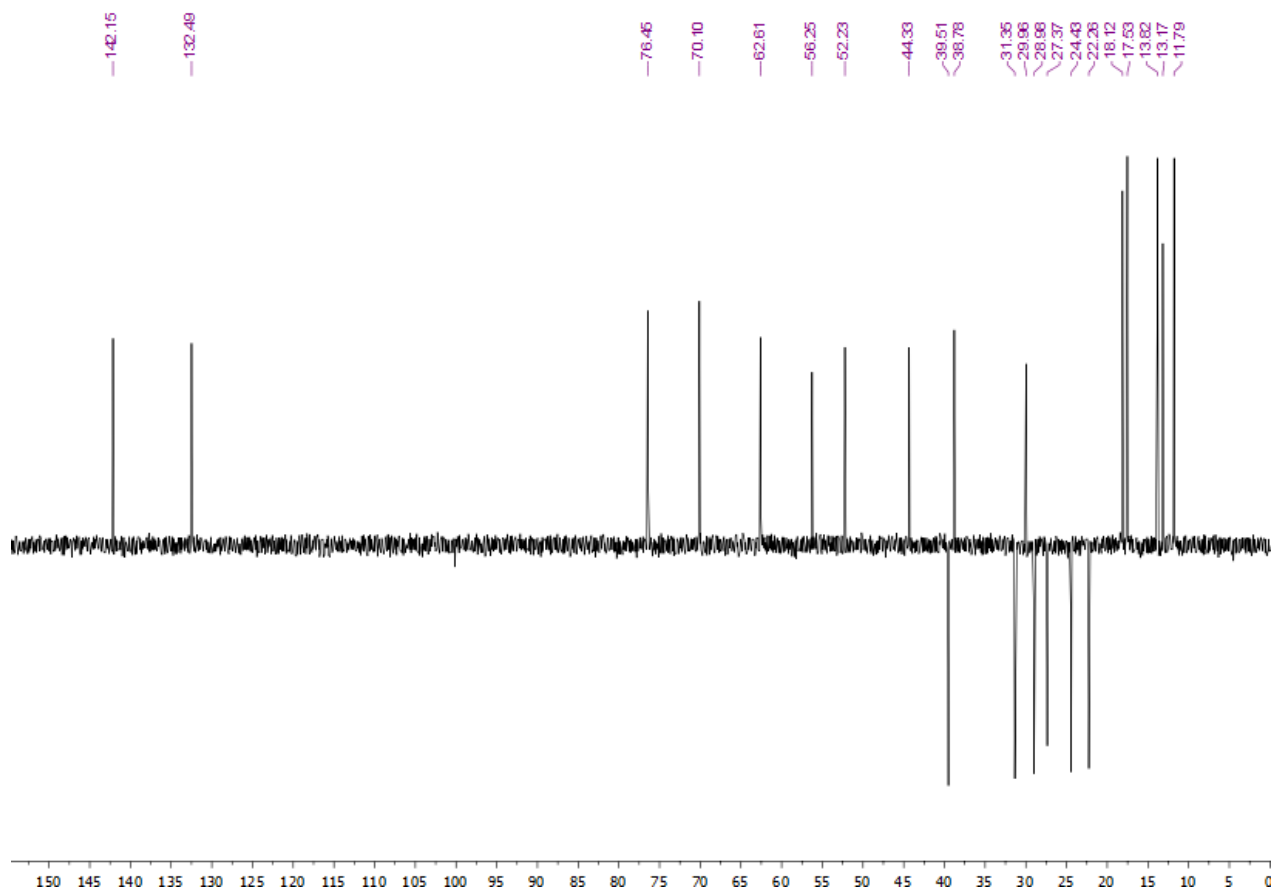


Figure S8. DEPT 135° NMR (75.47 MHz) spectrum of 1, in CDCl₃.

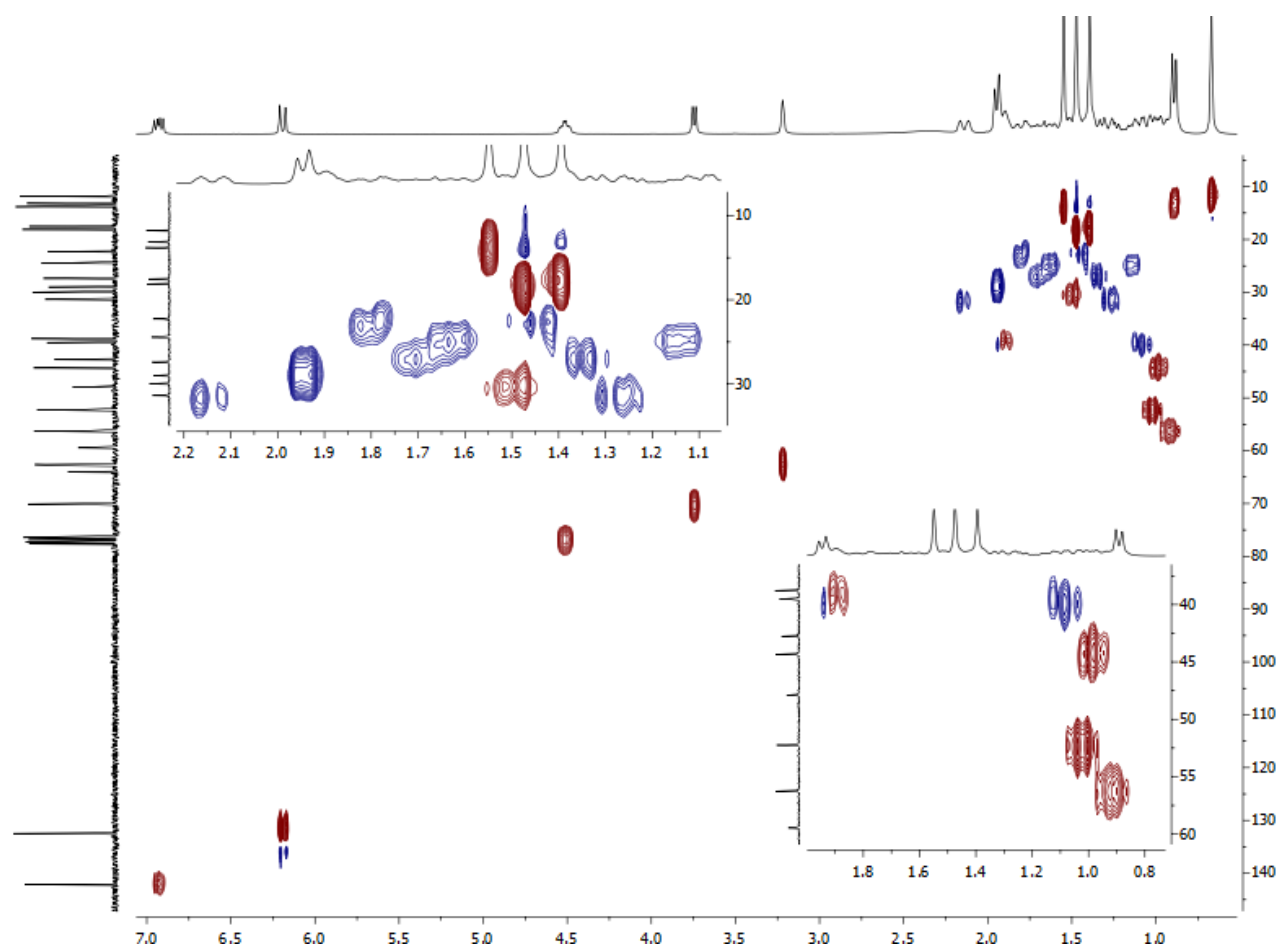


Figure S9. HSQC NMR spectrum of **1**, in CDCl_3 .

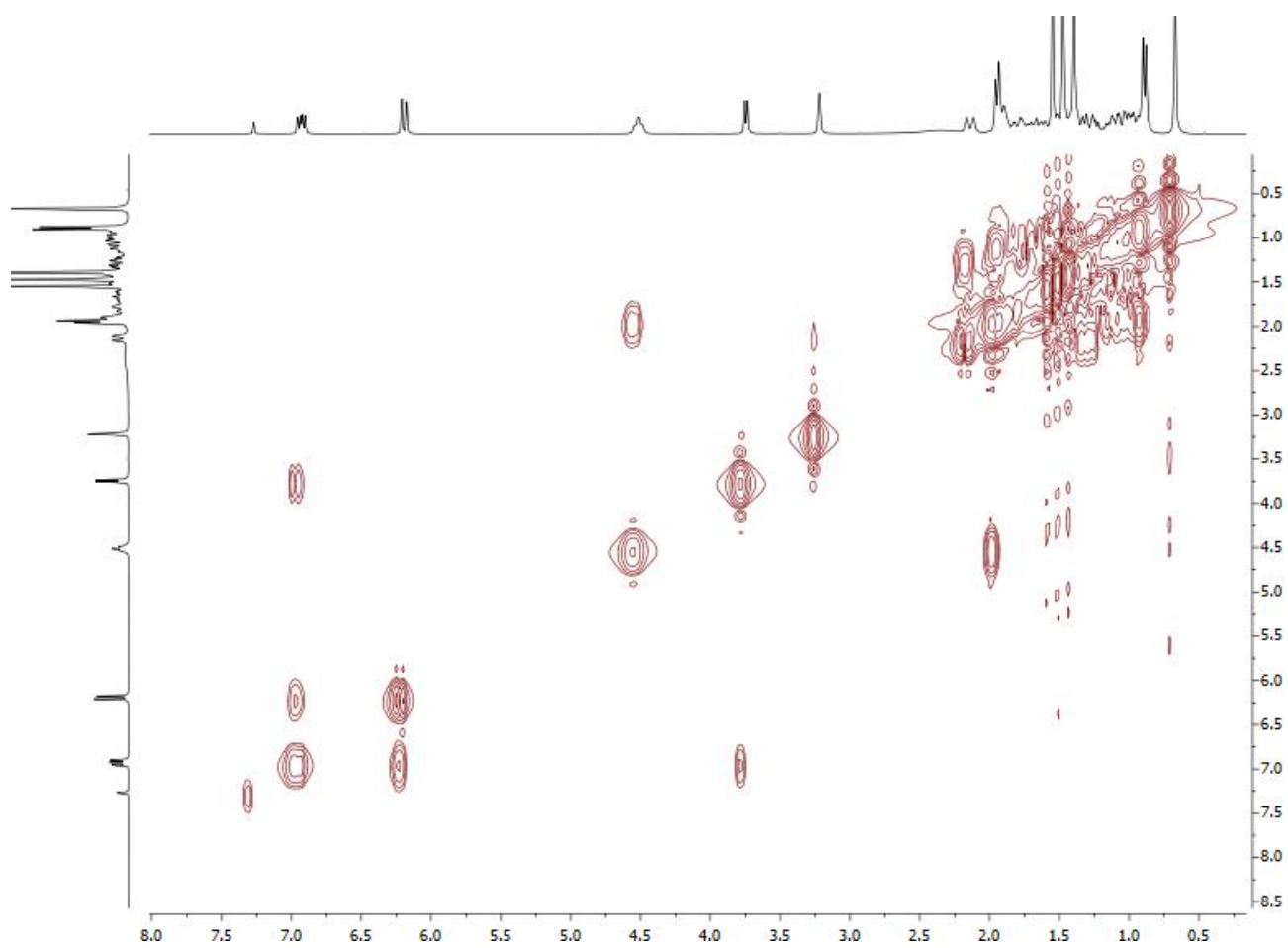


Figure S10. COSY NMR spectrum of **1**, in CDCl_3 .

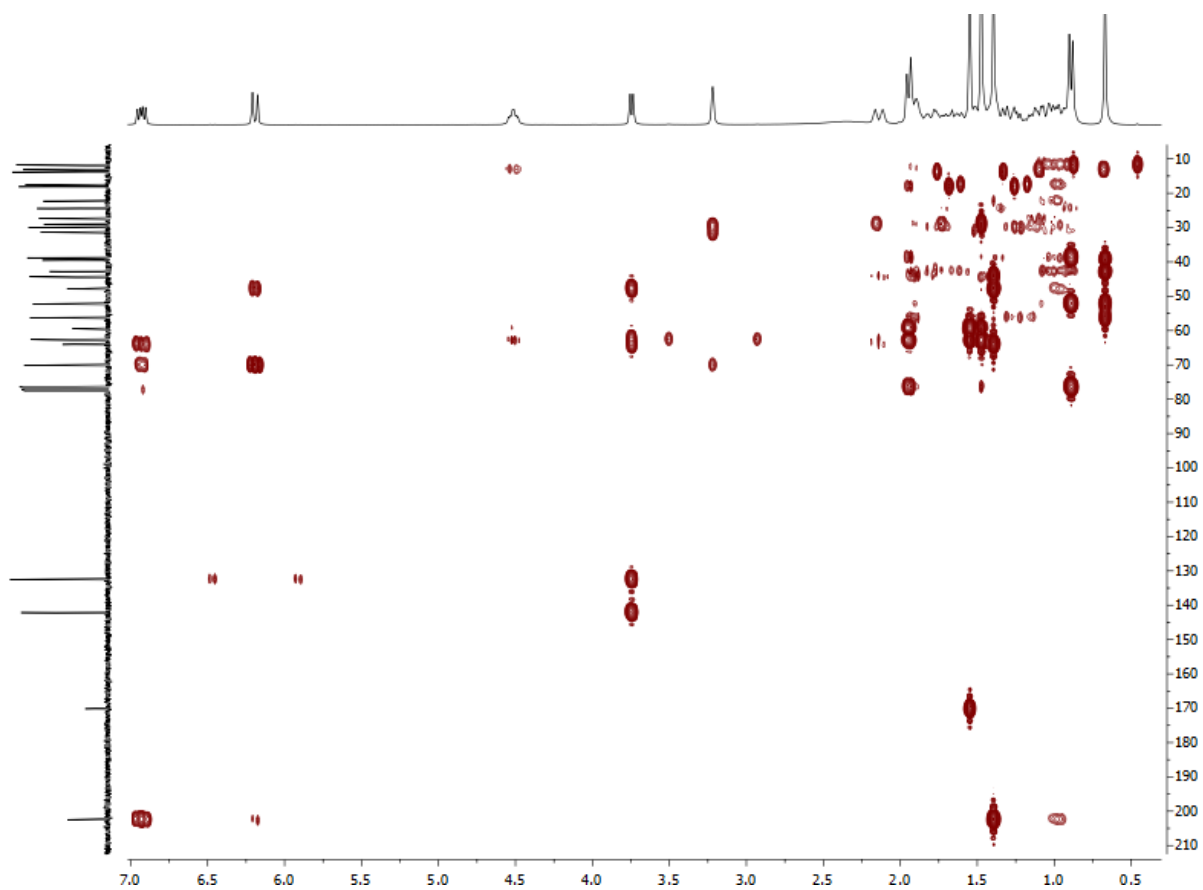


Figure S11. HMBC NMR spectrum of **1**, in CDCl₃.

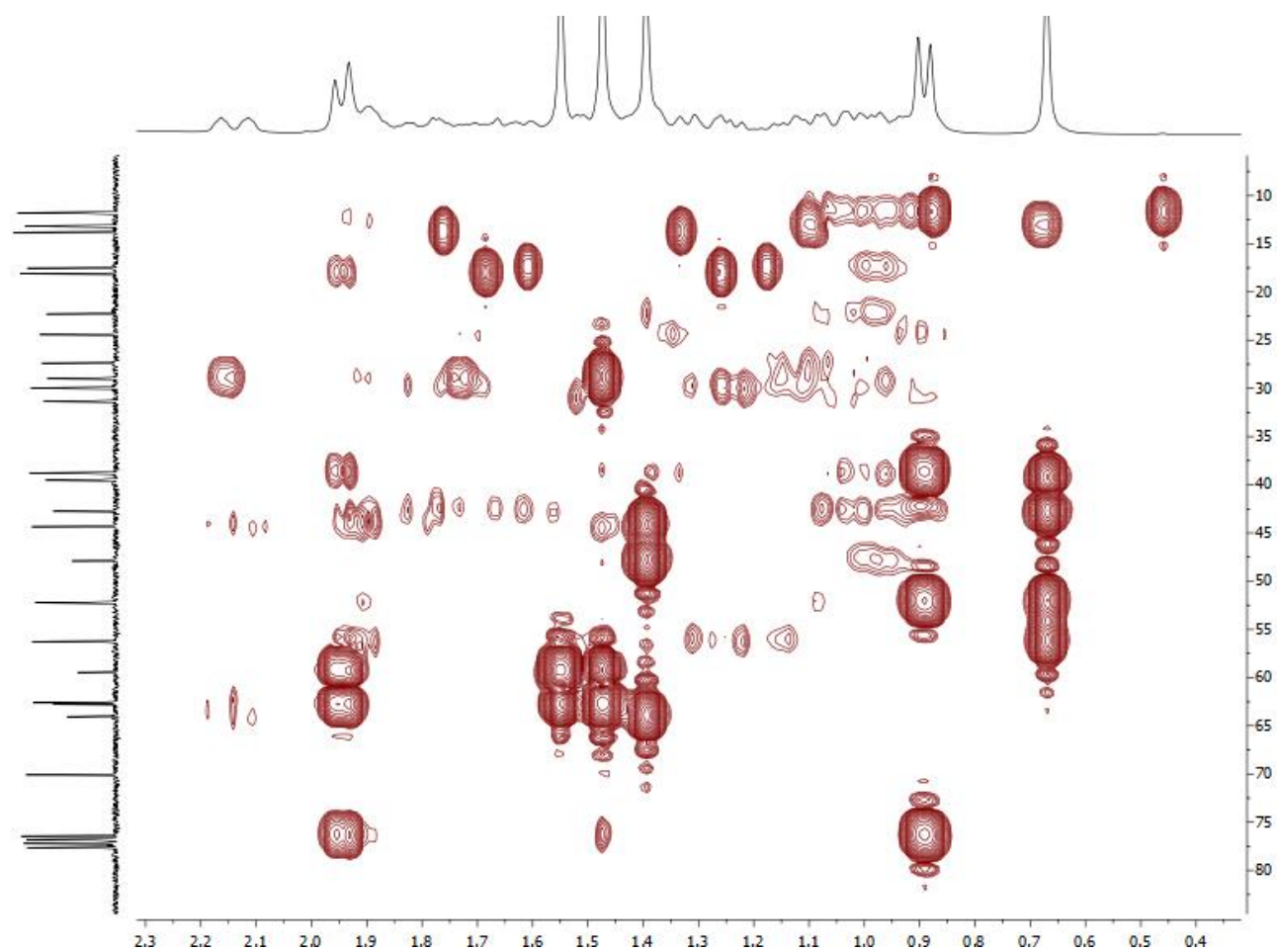


Figure S12. HMBC NMR spectrum of **1**, in CDCl₃.

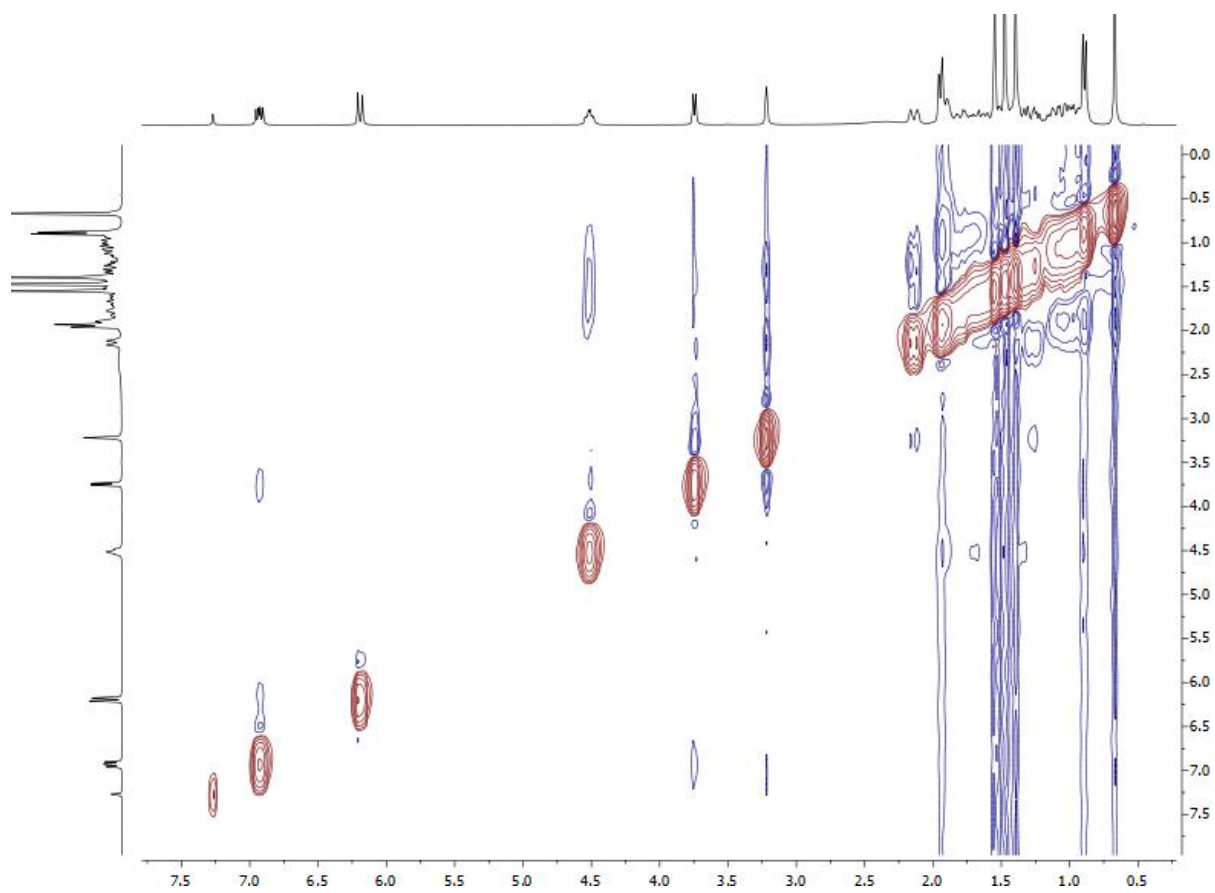


Figure S13. NOESY NMR spectrum of 1, in CDCl_3 .

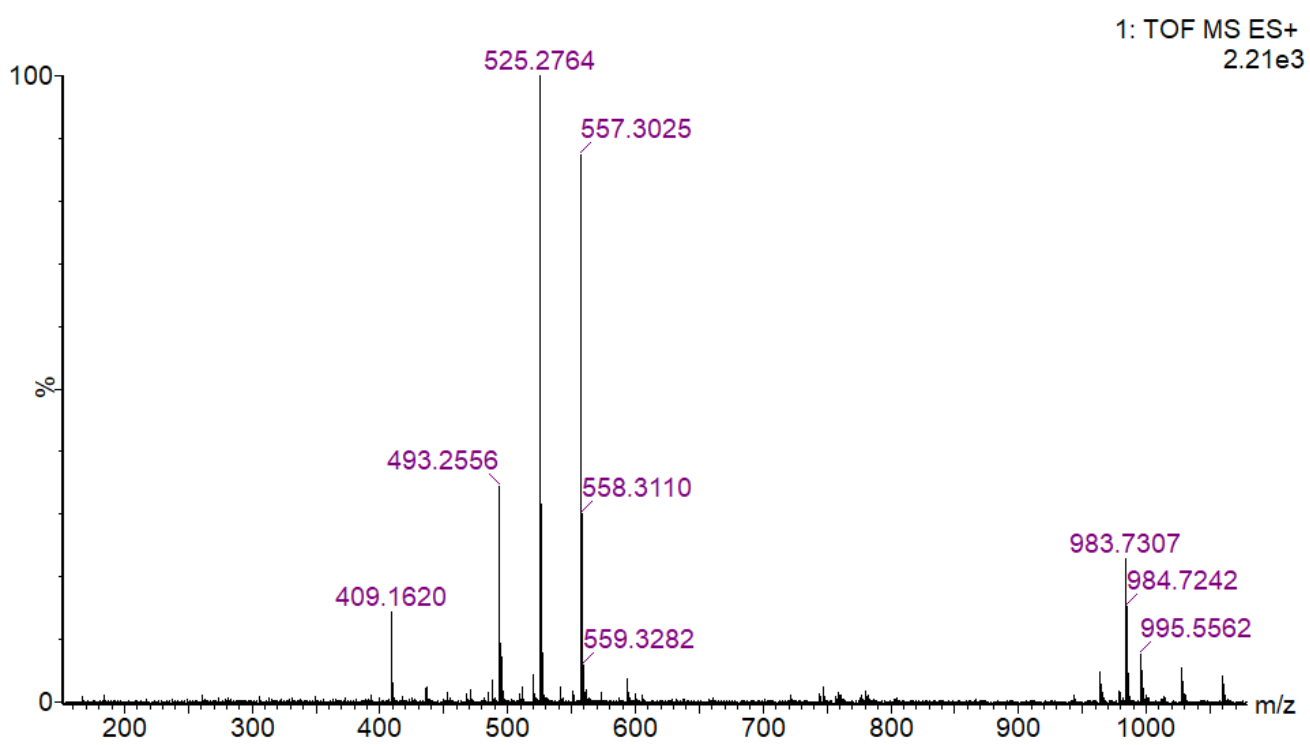


Figure S14. HRESIMS spectrum of **1**.

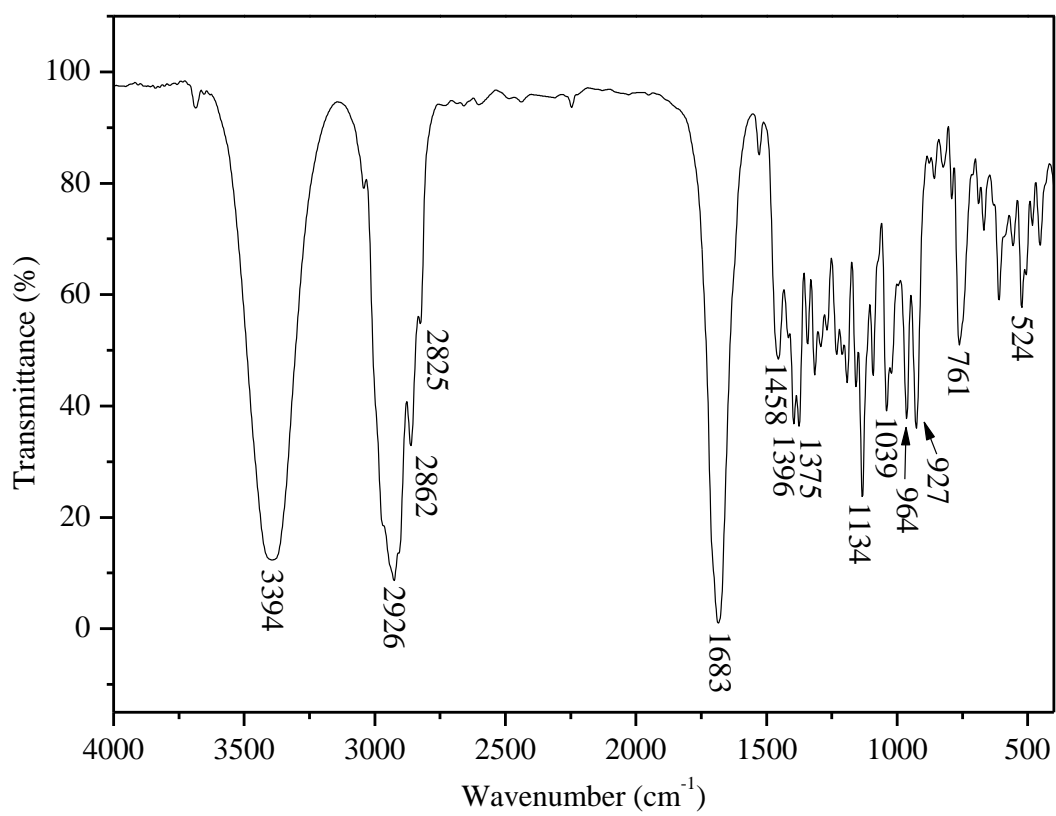


Figure S15. FTIR spectrum of **2**.

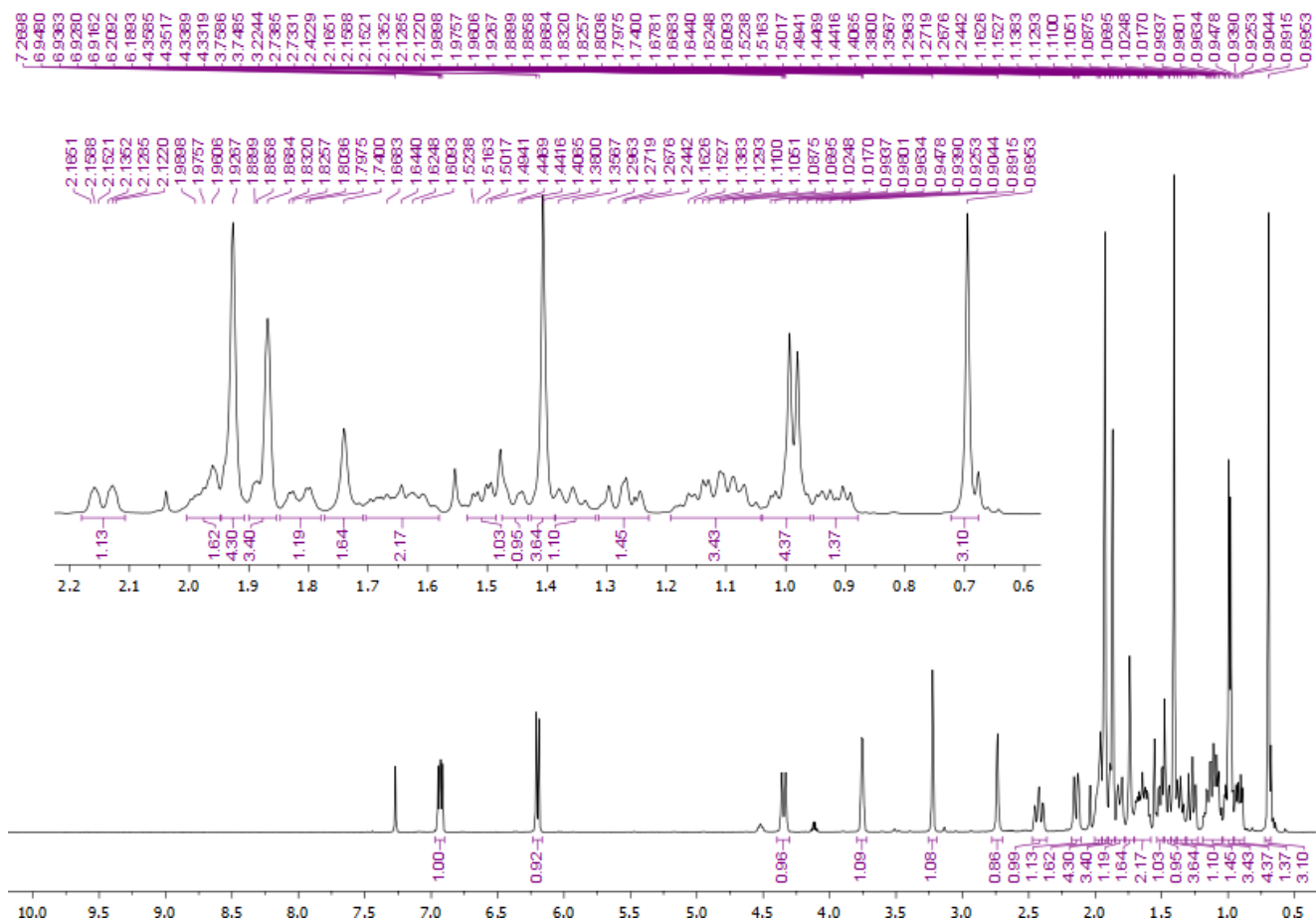


Figure S16. ^1H NMR (500.13 MHz) spectrum of **2**, in CDCl_3 .

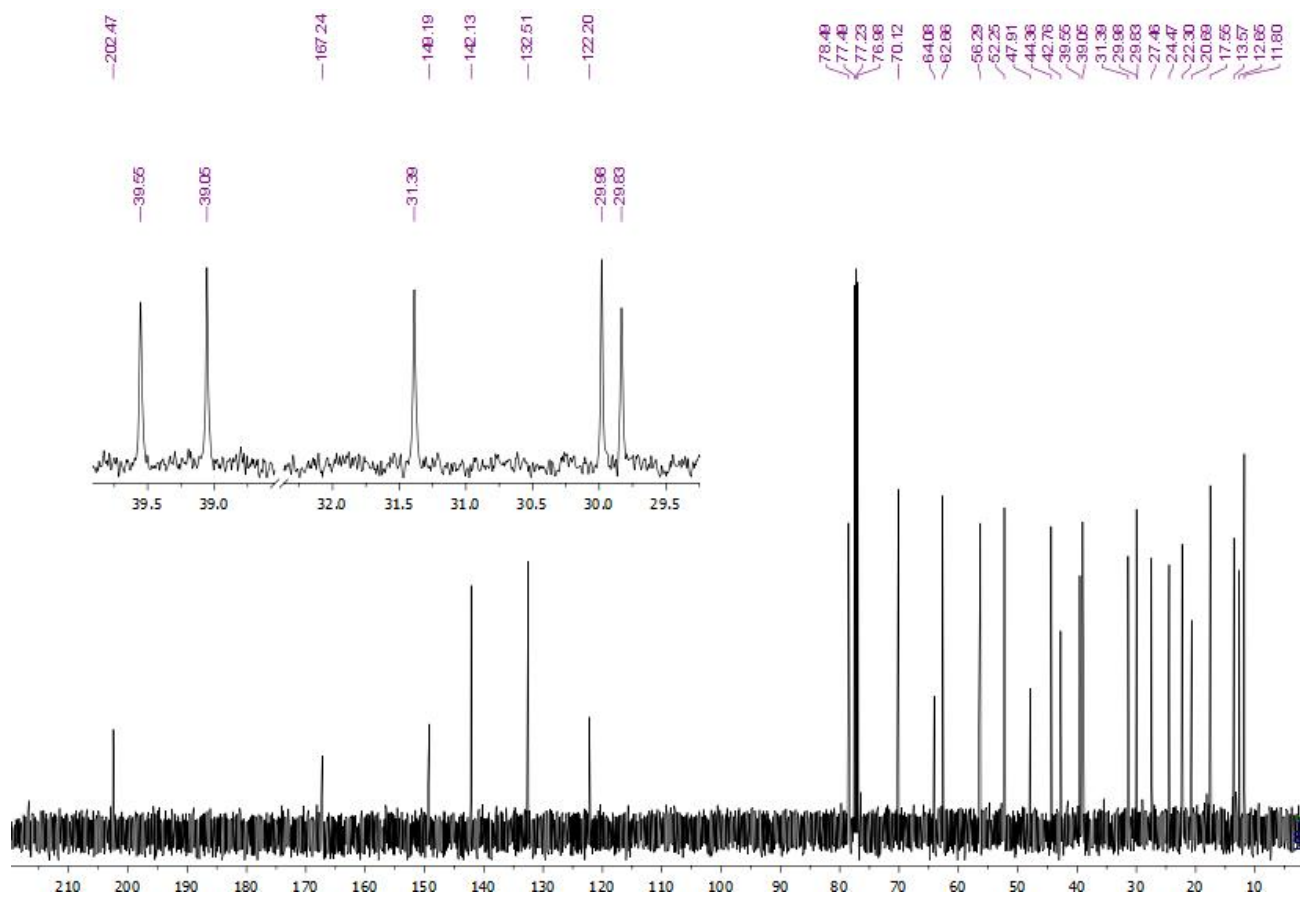


Figure S17. ^{13}C NMR (125.75 MHz) spectrum of **2**, in CDCl_3 .

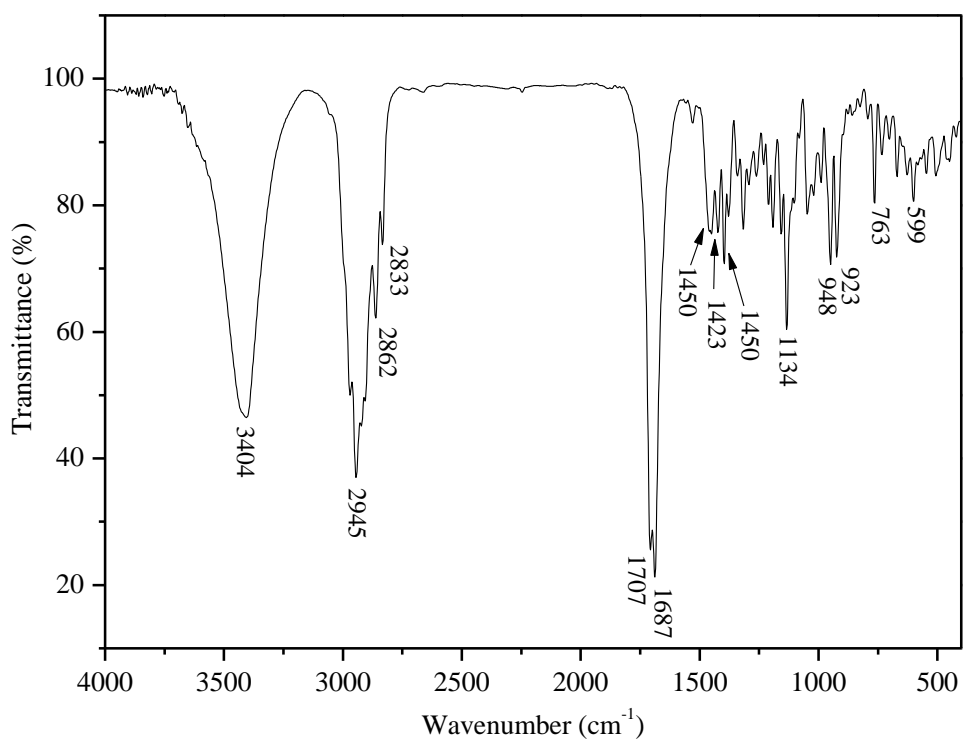


Figure S18. FTIR spectrum of 3.

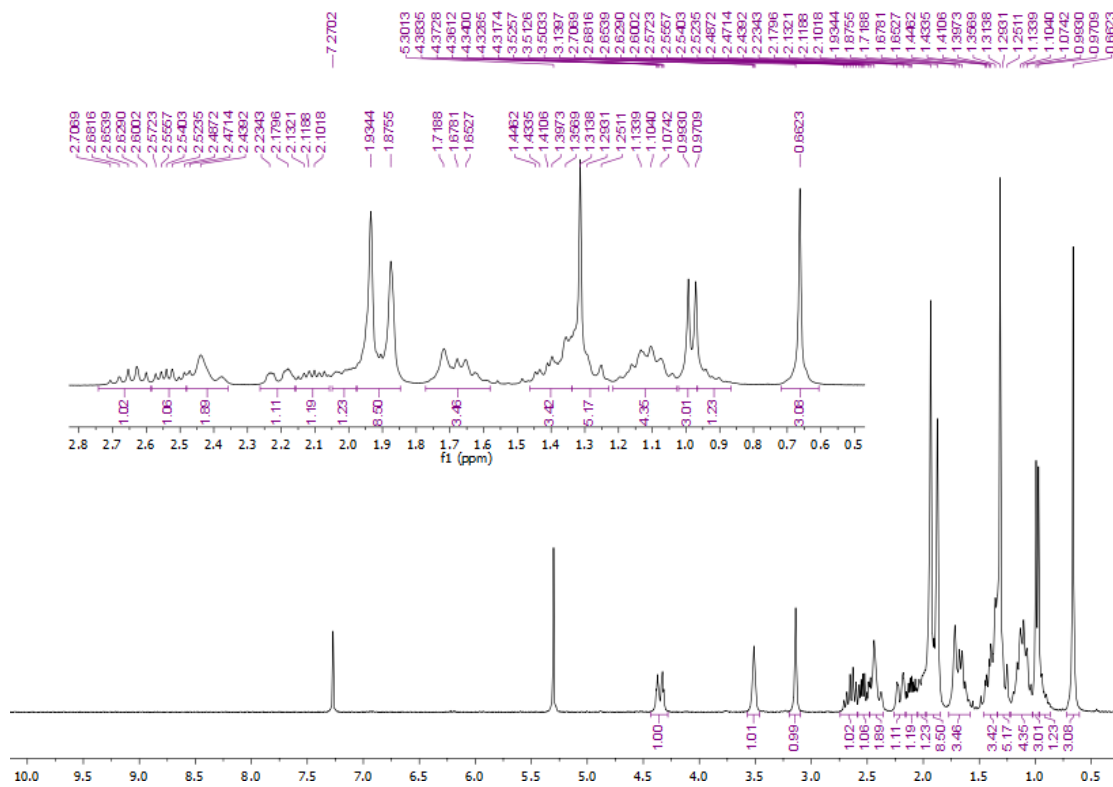


Figure S19. ¹H NMR (300.13 MHz) spectrum of 3, in CDCl₃.

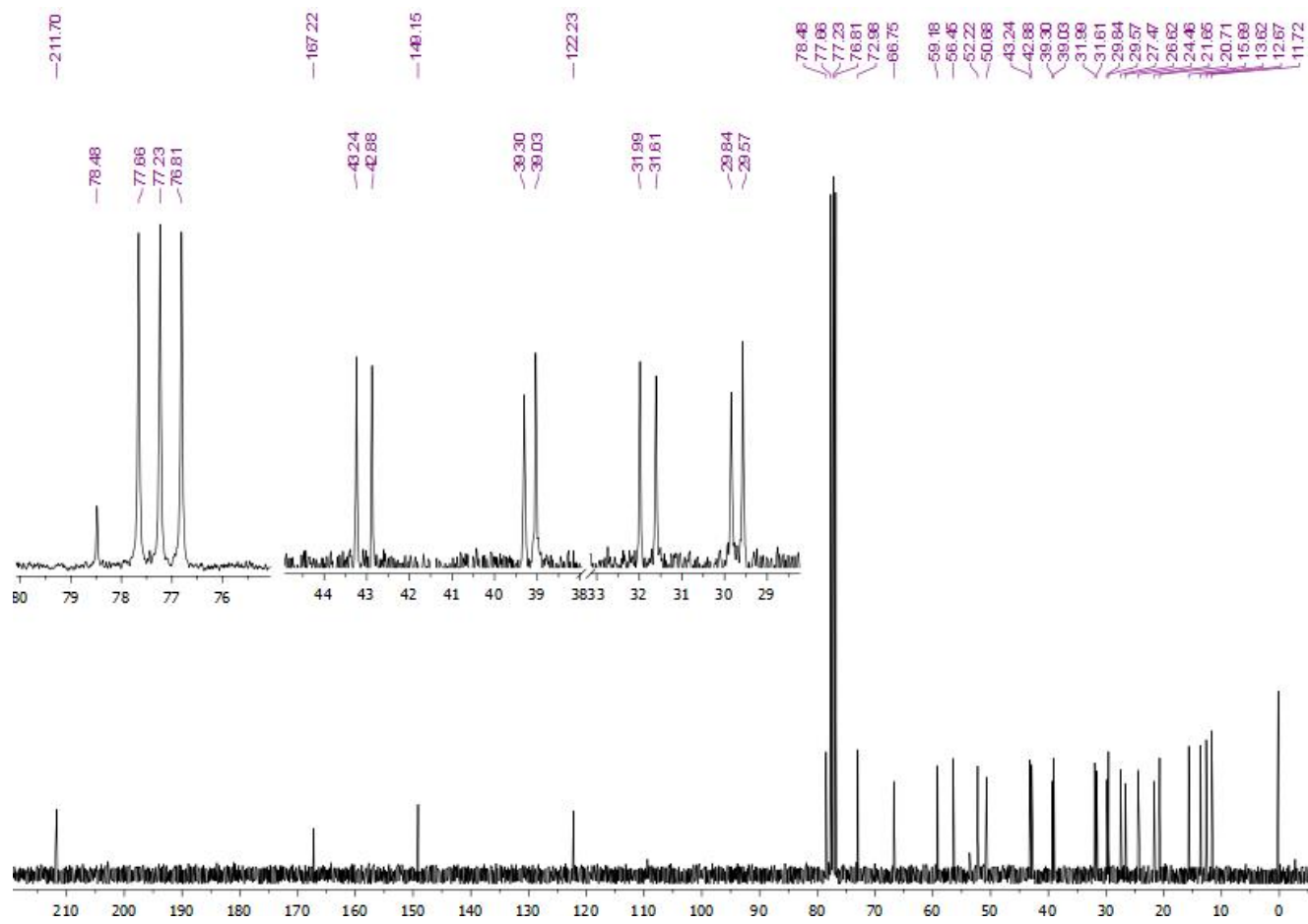


Figure S20. ^{13}C NMR (75.47 MHz) spectrum of **3**, in CDCl_3 .