



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

SAMUEL JOSÉ MENDES DOS SANTOS

**PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES DAS PROTEÍNAS 3CLpro E SPIKE
DO SARS-CoV-2: UM ESTUDO *IN SILICO* INTEGRADO**

FORTALEZA

2024

SAMUEL JOSÉ MENDES DOS SANTOS

PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES DAS PROTEÍNAS 3CLpro E SPIKE DO
SARS-CoV-2: UM ESTUDO *IN SILICO* INTEGRADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Orientador: Dr. Antoninho Valentini

FORTALEZA

2024

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)

S238p Santos, Samuel José Mendes dos.

Produtos naturais como inibidores das proteínas 3CLpro e Spike do SARS-CoV-2 : Um estudo in silico integrado / Samuel José Mendes dos Santos. – 2024.

117 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Antoninho Valentini.

1. Covid-19. 2. Ictexano. 3. Komaroviquinona. 4. Teoria do funcional da densidade. I. Título.
CDD 540

SAMUEL JOSÉ MENDES DOS SANTOS

**PRODUTOS NATURAIS COMO INIBIDORES DAS PROTEÍNAS 3CLpro E SPIKE DO
SARS-CoV-2: UM ESTUDO *IN SILICO* INTEGRADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.
Área de concentração: Química.

Aprovado em ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antoninho Valentini (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pierre Basilio Almeida Fechine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Claudenilson da Silva Clemente
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Poti e Silva
Instituto Federal do Ceará (IFCE)

Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

A Deus.

As minhas filhas, Ana Liz e Valentina.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul pelo apoio incondicional durante o período de licença remunerada concedida para a realização do doutorado na Universidade Federal do Ceará. Este apoio foi crucial para a conclusão das disciplinas e pesquisa e para as contribuições significativas realizadas neste campo de estudo. A oportunidade de dedicar-se integralmente ao projeto de doutorado foi fundamental para o desenvolvimento e sucesso desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Antoninho Valentini, pelo inestimável suporte e orientação ao longo de todo o desenvolvimento desta tese. Seu conhecimento, paciência e dedicação foram essenciais para superar os desafios e avançar com a pesquisa. A sua confiança em meu trabalho e os valiosos conselhos proporcionados foram fundamentais para a realização dos objetivos propostos. Agradeço por toda a inspiração e apoio contínuo durante esta jornada acadêmica.

Ao Dr. Dmitry Morozov, da University of Jyväskylä, Jyväskylä, Finlândia, Centro de Nanociência, Departamento de Química, cuja orientação foi inestimável ao longo deste trabalho, especialmente na parte de QM/MM. Seu compromisso em responder prontamente aos meus e-mails e esclarecer dúvidas, mesmo em meio às suas inúmeras responsabilidades, demonstrou não apenas sua excelência como pesquisador, mas também sua generosidade como mentor.

Ao Dr. Chenggong Hui, do Instituto Max Planck de Ciências Multidisciplinares, Departamento de Biofísica Teórica e Computacional, pela assistência detalhada na configuração dos arquivos .mdp. Sua expertise e disponibilidade para fornecer conselhos valiosos foram essenciais para o progresso e a qualidade deste trabalho.

Aos professores participantes da Banca de qualificação, Pierre Basilio Almeida Fechine, Eduardo Henrique Silva de Sousa e Bruno Poti e Silva, pelo tempo pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Universidade Federal do Ceará, que me acolheu em 2004 para iniciar minha jornada na graduação em Farmácia. Ao longo destes 20 anos, a UFC foi muito mais do que uma instituição de ensino; foi minha casa de aprendizado, onde pude crescer academicamente e pessoalmente. Desde a graduação, passando pelo mestrado e doutorado, a UFC sempre proporcionou o suporte e o ambiente necessários para o meu desenvolvimento. Agradeço imensamente a todos os professores, colegas e funcionários que contribuíram para essa trajetória inesquecível.

"O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão para existir."

Albert Einstein

RESUMO

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, paralisou o mundo e evidenciou a necessidade urgente de novos agentes terapêuticos capazes de inibir proteínas essenciais para a replicação e infectividade viral. Nesse contexto, investigou-se o potencial inibitório dos compostos naturais barbatusol, brussonol e komaroviquinona sobre as proteínas Mpro e Spike do SARS-CoV-2, com foco na variante Omicron BA.2, utilizando métodos *in silico*, cruciais para acelerar a descoberta e otimização de fármacos. Foram realizadas simulações de dinâmica molecular, docking molecular e cálculos de química quântica (QM/MM e DFT) para avaliar a estabilidade e as interações desses compostos com as proteínas-alvo. Adicionalmente, conduziram-se estudos ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) para prever as propriedades farmacocinéticas dos ligantes, essenciais para determinar a eficácia e segurança de novos medicamentos. A importância desses estudos reside na capacidade de selecionar compostos que não apenas são eficazes, mas também possuem um perfil de segurança favorável, minimizando efeitos adversos. Além disso, realizaram-se análises de fingerprint molecular utilizando MACCS-166 e ECFP-6 para caracterizar a similaridade estrutural com compostos conhecidos, o que auxilia na identificação de propriedades funcionais e na predição de comportamentos farmacológicos. A caracterização dos sítios de ligação das proteínas foi realizada com base na literatura e nas ferramentas ProBiS, GRaSP e COACH, que permitiram identificar interações críticas para a eficácia dos compostos. Os resultados indicaram que barbatusol, brussonol e komaroviquinona apresentam afinidades de ligação similares às dos padrões nirmatrelvir e mefloquina, sugerindo seu potencial como candidatos a agentes antivirais contra o SARS-CoV-2. A análise ADMET revelou que os produtos naturais estudados possuem propriedades farmacocinéticas superiores e perfis de toxicidade mais favoráveis em relação ao nirmatrelvir, indicando um potencial terapêutico promissor e mais seguro contra a COVID-19. Conclui-se que os compostos estudados são moléculas candidatas promissoras a fármacos e podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas terapias antivirais.

Palavras-chave: COVID-19; Ictexano; Komaroviquinona; teoria do funcional da densidade.

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, brought the world to a standstill and underscored the urgent need for new therapeutic agents capable of inhibiting proteins essential for viral replication and infectivity. In this context, the inhibitory potential of the natural compounds barbatusol, brussonol, and komaroviquinona against the SARS-CoV-2 Mpro and Spike proteins, with a focus on the Omicron BA.2 variant, was investigated using *in silico* methods, which are crucial for accelerating drug discovery and optimization. Molecular dynamics simulations, molecular docking, and quantum chemistry calculations (QM/MM and DFT) were performed to evaluate the stability and interactions of these compounds with the target proteins. Additionally, ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) studies were conducted to predict the pharmacokinetic properties of the ligands, which are essential for determining the efficacy and safety of new drugs. The importance of these studies lies in the ability to select compounds that are not only effective but also possess a favorable safety profile, minimizing adverse effects. Furthermore, molecular fingerprint analyses using MACCS-166 and ECFP-6 were conducted to characterize the structural similarity with known compounds, aiding in the identification of functional properties and the prediction of pharmacological behaviors. The binding site characterization of the proteins was carried out based on literature and the tools ProBiS, GRaSP, and COACH, which enabled the identification of critical interactions contributing to the efficacy of the compounds. The results indicated that barbatusol, brussonol, and komaroviquinona exhibit binding affinities similar to those of the reference compounds nirmatrelvir and mefloquina, suggesting their potential as antiviral candidates against SARS-CoV-2. ADMET analysis revealed that the natural products studied possess superior pharmacokinetic properties and more favorable toxicity profiles compared to nirmatrelvir, indicating a promising and safer therapeutic potential against COVID-19. It is concluded that the studied compounds are promising drug candidates and may significantly contribute to the development of new antiviral therapies.

Keywords: COVID-19; Icetexane; Komaroviquinone; density functional theory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número acumulado de casos de COVID-19 notificados à OMS no mundo, distribuídos por regiões geográficas. Cada círculo representa a quantidade de casos em cada local, com as cores correspondendo às diferentes regiões.....	20
Figura 2 -	Estrutura e ciclo replicativo do SARS-CoV-2: (A) Estrutura do vírus (B) Ciclo de infecção e replicação viral. (C) Organização do genoma do SARS-CoV-2.....	23
Figura 3 -	Estruturas moleculares em 3D dos compostos barbatusol, brussonol e komaroquinona (da esquerda para a direita)	25
Figura 4 -	Representação comparativa das estruturas PDB ID 6LU7 e 6M2Q. À esquerda, a estrutura monomérica do PDB ID 6LU7 é representada, com o Domínio I destacado em vermelho (resíduos 8-101), o Domínio II em azul (resíduos 102-184) e o Domínio III em amarelo (resíduos 201-303). O sítio de ligação, localizado entre os Domínios I e II, está destacado em laranja. À direita, a estrutura dímera do PDB ID 6M2Q é ilustrada, com a Cadeia A em azul e a Cadeia B em vermelho, cada uma apresentando seus respectivos sítios de ligação.....	37
Figura 5 -	Representação detalhada da proteína Spike Omicron BA.2 SARS-CoV-2 (PDB ID: 8D55). O painel A ilustra a proteína Spike em sua conformação trimérica, com as cadeias orientadas como na estrutura central. O painel B destaca as localizações dos ligantes, identificados por seus respectivos rótulos. O painel C apresenta os sítios de ligação reportados na literatura. As cadeias estão representadas em cores distintas: Cadeia A em azul, Cadeia B em verde-limão e Cadeia C em magenta. Os sítios de ligação são codificados por cores específicas: o da Cadeia A em laranja, o da Cadeia B em vermelho e o da Cadeia C em ciano. Essa representação fornece uma visualização clara e detalhada das regiões conformacionais da proteína e dos locais de interação com os ligantes.....	39
Figura 6 -	Estruturas médias da proteína Mpro SARS-CoV-2 em complexo com diferentes ligantes de simulações de dinâmica molecular, destacando	

resíduos chave da interação. (a) Proteína e barbatusol em água, (b) Proteína e brussonol em água, (c) Proteína e komaroviquinona em água, e (d) Proteína e nirmatrelvir em água. As figuras mostram o ligante no sítio de ligação e os resíduos interagindo no local. As estruturas foram derivadas da análise de covariância utilizando o software GROMACS (gmx covar).....	59
Figura 7 - Representação de ligantes e seus principais resíduos interagindo dentro do sítio de ligação. As interações são ilustradas usando LigPlot. (a) Proteína e barbatusol em água, (b) Proteína e brussonol em água, (c) Proteína e komaroviquinona em água, e (d) Proteína e nirmatrelvir em água.....	63
Figura 8 - Identificação de resíduos-chave na proteína spike SARS-CoV-2 (PDB ID: 8D55) usando vários servidores de previsão de bioinformática. O servidor ProBiS (extrema esquerda) destaca os resíduos conservados, essenciais para a função e interação das proteínas, em laranja e vermelho. O servidor TM-SITE (segundo da esquerda) identifica resíduos críticos envolvidos nas interações de ligação, marcados em verde. O S-SITE (meio) prevê resíduos de interação significativos, exibidos em magenta, enquanto o servidor COFACTOR (segundo da direita) destaca de forma semelhante os resíduos funcionalmente importantes, também em magenta. O servidor ConCavity (extrema direita) identifica possíveis cavidades de ligação com resíduos significativos mostrados em magenta.	71
Figura 9 - Interação dos ligantes brussonol, komaroviquinona e mefloquina com os principais resíduos da proteína Spike da variante SARS-CoV-2 BA.2 nos locais A, B e C, gerados usando o programa LIGPLOT. A figura destaca as ligações de hidrogênio (linhas tracejadas verdes), com as distâncias mostradas ao longo da linha verde em angstroms (Å) e interações hidrofóbicas (semicírculos vermelhos) entre cada ligante e os resíduos correspondentes em cada local de ligação. Para maior clareza, os nomes dos resíduos, seus números e respectivos monômeros são indicados entre parênteses, por exemplo, Asp291 (C) corresponde ao resíduo de aspartato numerado 291 no monômero C.....	82

Figura 10 - Mapa de potencial eletrostático das moléculas mefloquina, komaroviquinona e brussonol interagindo com os resíduos SER602, ASN603 e GLN604 da proteína Spike SARS-CoV-2. A figura visualiza as interações eletrostáticas entre os ligantes e esses resíduos-chave, com ênfase particular na interação significativa observada entre as três moléculas e o ASN603.....	94
Figura 11 - Analise de fukui, imagem gerada usando software Chemcraft após aplicar a função $f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r)$. (a) barbatusol, (b) brussonol, (c) komaroviquinona e (d) nirmatrelvir.....	100
Figura 12 - Orbitais HOMO e LUMO dos compostos estudados. A figura apresenta os orbitais na seguinte ordem: (a) barbatusol HOMO, (b) barbatusol LUMO, (c) brussonol HOMO, (d) brussonol LUMO, (e) komaroviquinona HOMO, (f) komaroviquinona LUMO, (g) nirmatrelvir HOMO e (h) nirmatrelvir LUMO. Essas visualizações fornecem insights sobre as propriedades eletrônicas dos compostos e seu potencial reativo com a proteína Mpro do SARS-CoV-2.....	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise do RMSD. (a) e (b) Monômero e Dímero em água sem ligante, respectivamente. (c) (e) (g) (i) sistemas com monômero e os ligantes barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, respectivamente. (d) (f) (h) (j) sistema com dímero e os ligante barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, respectivamente.....	60
Gráfico 2 -	Gráfico com as etapas de simulação versus energia eletrostática QM/MM para os quatro ligantes: barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir. O gráfico representa a energia de interação eletrostática dos compostos com a proteína Mpro do SARS-CoV-2 ao longo das etapas de simulação.....	67
Gráfico 3 -	Análise do RMSD da glicoproteína Spike da variante SARS-CoV-2 Omicron em complexo com os ligantes mefloquina, komaroviquinona e brussonol em 100 ns de simulações de dinâmica molecular.....	86
Gráfico 4 -	Gráficos onde cada barra representa a diferença entre o RMSF do resíduo presente na simulação da proteína spike e 51 NAGs e glicanos em água, e o RMSF do mesmo resíduo porém na simulação da proteína spike, 51 NAGs e glicanos, e um ligante (mefloquina, komaroviquinona ou brussonol) na água. Os valores são dados em Ångströms (Å). As barras correspondentes à mefloquina são mostradas em azul, komaroviquinona em laranja e brussonol em cinza.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Energias de ligação (kcal/mol) obtidas nas simulações de docking molecular para as estruturas monomérica (PDB ID 6LU7) e dimérica (PDB ID 6M2Q) da Mpro com os ligantes barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, avaliadas em diferentes intervalos de tempo das simulações de dinâmica molecular (0 ns a 300 ns).....	55
Tabela 2 -	Energias de interação calculadas (em kcal/mol) para os compostos barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir com a proteína Mpro do SARS-CoV-2. Os valores estão detalhados para os estados monomérico (6LU7) e dimerico (6M2Q) nos sítios de ligação A e B. São apresentadas as contribuições específicas das interações de Coulomb de curto alcance (Coul-SR) e de Lennard-Jones de curto alcance (LJ-SR), bem como a energia total de interação (TOTAL) para cada composto e configuração.....	64
Tabela 3 -	Energias calculadas (em kcal/mol) para os compostos barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, quando interagindo com a enzima Mpro do SARS-CoV-2, tanto em sua forma monomérica (6LU7) quanto dimerizada nos sítios de ligação A e B (6M2Q). São apresentados os valores das energias de van der Waals (VDWAALS), energia eletrostática (EEL), energia de solvatação polar (EGB) e apolar (ESURF), energia total em fase gasosa (GGAS), energia total de solvatação (GSOLV) e a energia total de ligação (TOTAL) para cada cenário.....	66
Tabela 4 -	Resíduos previstos do local de ligação para a proteína spike do SARS-CoV-2 (PDB ID: 8D55) conforme identificado por vários métodos computacionais. A tabela lista os clusters de locais de ligação previstos, os métodos usados (SST: Site-Search Tool, COF: COFACTOR, TMS: TM-SITE, CON: ConCavity), PDB correspondentes, ligantes, pontuações C e os resíduos específicos identificados em cada local de ligação previsto.....	72
Tabela 5 -	Resumo das Interações por Ligações de Hidrogênio, Interações Hidrofóbicas, Pontuações de Docking, Número Médio de Ligações de	

Hidrogênio por Quadro na DM, Distância Mínima Média na DM e RMSD (Ligante-Proteína) para os NAGs e Glicanos do PDB ID 8D55.	73
Tabela 6 - Energias de interação calculadas (kcal/mol) de mefloquina, komaroviquinona e brussonol com a glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 trimerizada, nos locais de ligação A, B e C (PDB ID: 8D55). Contribuições específicas das interações de Coulomb de curto alcance (Coul-SR) e interações de Lennard-Jones de curto alcance (LJ-SR) são apresentadas, bem como a energia total de interação (TOTAL) para cada composto e configuração.....	92
Tabela 7 - Energias de interação calculadas (kcal/mol) para mefloquina, komaroviquinona e brussonol com a glicoproteína Spike do SARS-CoV-2, nos locais de ligação A, B e C (PDB ID: 8D55). os valores das energias de van der Waals (VDWAALS), energia eletrostática (EEL), energia de solvatação polar (EGB) e apolar (ESURF), energia total em fase gasosa (GGAS), energia total de solvatação (GSOLV) e a energia total de ligação (TOTAL) para cada cenário.....	92
Tabela 8 - Estudo ADMET das substâncias sob investigação. Os resultados incluem predições de propriedades relacionadas à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade das substâncias. Os dados foram obtidos do site https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcs/ e estão organizados de acordo com o modelo de predição, valor previsto e unidade de medida.....	96
Tabela 9 - Análise de Fingerprint usando MACCS-166 e ECFP-6.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	SARS-CoV-2 e Mecanismos de Infecção.....	21
2.2	Diterpenoides Ictexanos: Propriedades e Aplicações Terapêuticas.....	24
2.3	Ferramentas para Caracterização de Sítios de Ligação.....	26
2.4	Triagem Virtual de Compostos Bioativos.....	28
2.5	Análise de Interações por Docking Molecular.....	29
2.6	Simulações de Dinâmica Molecular.....	31
2.7	Aspectos ADMET e Ferramentas de Avaliação Computacional.....	33
2.8	Análise de Similaridade Molecular por Fingerprints.....	34
2.9	Estudo de Reatividade Molecular com Funções de Fukui.....	35
3	METODOLOGIA.....	36
3.1	Preparação dos Ligantes e das Estruturas Proteicas.....	36
3.2	Caracterização dos Sítios de Ligação: GRaSP, ProBiS e COACH.....	40
3.3	Triagem Virtual, Docking Molecular e Dinâmica Molecular: Procedimentos e Parâmetros.....	40
3.4	Cálculos de Energia, QM/MM e DFT: Métodos e Aplicações.....	45
3.5	Estudo dos Produtos Naturais e Compostos de Referência: Estudos ADMET, Fingerprint Molecular (MACCS-166 e ECFP-6) e Análise de Reatividade (Função de Fukui).....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Estudo de Caso I: Inibição da Proteína Mpro.....	52
4.1.1	Caracterização do Sítio de Ligação.....	52
4.1.2	Resultados de Docking Molecular.....	53
4.1.3	Resultados de Dinâmica Molecular.....	56
4.2	Estudo de Caso II: Inibição da Proteína Spike.....	68
4.2.1	Caracterização do Sítio de Ligação.....	68
4.2.2	Resultados de Docking Molecular.....	73
4.2.3	Resultados das Simulações de Dinâmica Molecular.....	84
4.2.4	Análise Energética e Eletrostática das Interações Ligante-Proteína.....	93

4.3	Avaliação dos Produtos Naturais e Compostos de Referência: Estudo ADMET, Fingerprints e Reatividade Molecular com Base nas Funções de Fukui e Energias dos Orbitais HOMO e LUMO.....	95
5	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS.....	104
	ANEXO A – LISTA DAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS.....	117
	ANEXO B – GRAVURAS REFERENTE AS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

No final de 2002, uma doença infecciosa até então desconhecida, posteriormente denominada Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), emergiu na cidade de Foshan, na província de Guangdong, ao sul da China, despertando rapidamente a atenção mundial devido ao seu alto potencial de transmissão e à gravidade de seus sintomas. Em 11 de fevereiro de 2003, o Ministério da Saúde chinês relatou um surto de pneumonia de causa desconhecida à Organização Mundial da Saúde (OMS). Entre novembro de 2002 e o verão de 2003, em um período de 114 dias, a OMS registrou 8.098 casos prováveis de SARS e 774 mortes em 29 países. A SARS foi a primeira epidemia transmitida por viagens aéreas, quase paralisando a economia asiática. Acredita-se que as medidas agressivas de quarentena, combinadas com o aumento das temperaturas durante o verão, tenham sido eficazes para conter a primeira onda da SARS, proporcionando uma pausa temporária (DE WIT et al, 2016) (Stadler et al, 2003).

Em abril de 2012, dez anos após o surgimento do SARS-CoV, um conjunto de casos de doença respiratória grave foi registrado em um hospital na Jordânia. Em junho do mesmo ano, um novo coronavírus, conhecido como síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), foi isolado a partir do escarro de um homem na Arábia Saudita. Em setembro de 2012, foram identificados três casos de MERS no Reino Unido. Em maio de 2015, uma única pessoa retornando do Oriente Médio desencadeou um surto nosocomial de MERS na Coreia do Sul, envolvendo 16 hospitais e infectando 186 pacientes. Até 26 de abril de 2016, haviam sido confirmados 1.728 casos de MERS, com 624 mortes em 27 países. O surto destacou a capacidade do MERS-CoV de se espalhar rapidamente em ambientes hospitalares e a gravidade da doença, com uma alta taxa de letalidade. Desde então, o MERS-CoV continua sendo monitorado pela comunidade internacional de saúde, com esforços contínuos para entender melhor seu comportamento e prevenir novos surtos, especialmente em regiões onde o contato com camelos, considerados os principais reservatórios do vírus, é comum (Park et al, 2018).

No dia 31 de dezembro de 2019, a OMS foi informada sobre um grupo de casos de pneumonia ocorrendo na cidade de Wuhan, na província de Hubei, China. Posteriormente, verificou-se que esses casos eram causados por uma nova cepa de coronavírus, até então desconhecida em humanos. Em 7 de janeiro de 2020, as autoridades chinesas confirmaram a identificação deste novo coronavírus, inicialmente denominado 2019-nCoV.

No dia 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou que o surto de coronavírus configurava uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), o mais alto nível de alerta da OMS, conforme estabelecido pelo Regulamento Sanitário Internacional.

O objetivo dessa declaração foi intensificar a coordenação, colaboração e solidariedade global para conter a disseminação do vírus. De acordo com o Regulamento Sanitário Internacional, uma ESPII é definida como “um evento extraordinário que pode representar um risco à saúde pública para outros países devido à propagação internacional de doenças, e que pode exigir uma resposta internacional coordenada e imediata”.

Em 11 de fevereiro de 2020, o vírus foi oficialmente nomeado como SARS-CoV-2, responsável pela doença conhecida como COVID-19. Em 11 de março de 2020, a OMS classificou a COVID-19 como uma pandemia, um termo que se refere à ampla distribuição geográfica da doença, sem necessariamente indicar sua gravidade, reconhecendo que a COVID-19 já estava se espalhando em diversos países e regiões ao redor do mundo. Em 5 de maio de 2023, o Comitê de Emergência da OMS recomendou ao Diretor-Geral o encerramento da ESPII relacionada à COVID-19, recomendação que foi aceita. Contudo, essa decisão não implica que a COVID-19 tenha deixado de representar um risco significativo à saúde global.

Em 8 de junho de 2024, a OMS relatou um total de 775,6 milhões de casos de COVID-19 e aproximadamente 7 milhões de mortes atribuíveis à doença em todo o mundo (ver figura 1). Cerca de 13,59 bilhões de doses de vacinas COVID-19 foram administradas em todo o mundo, com 67% da população global tendo completado uma série de vacinação primária e 32% tendo recebido pelo menos uma dose de reforço. A doença continua sendo uma preocupação, especialmente devido à sua capacidade de evoluir e gerar novas variantes (World Health Organization, 2024).

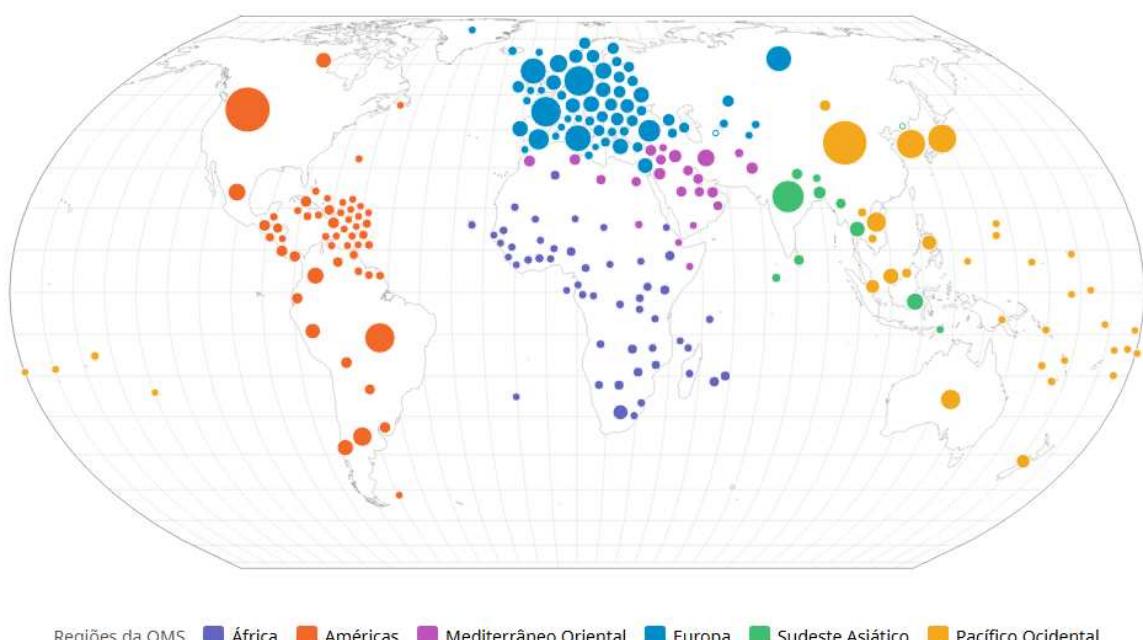
Um aspecto notável desta pandemia é a evolução contínua do SARS-CoV-2, que levou ao surgimento de múltiplas Variantes de Preocupação (VOCs) e Variantes de Interesse (VOIs). Essas variantes são designadas pela OMS com base em seu potencial avaliado para expansão e substituição de variantes anteriores, desencadeando novas ondas de infecção com aumento da circulação e necessitando de ajustes nas estratégias de saúde pública. Os VOCs são variantes que, além de se espalharem mais rapidamente, podem causar doenças mais graves ou reduzir a eficácia das vacinas ou tratamentos disponíveis. Enquanto isso, os VOIs são identificados por alterações genéticas que são previstas ou conhecidas por influenciar as características virais, incluindo transmissibilidade, patogenicidade ou a capacidade de escapar da imunidade. Essas variantes foram implicadas na transmissão comunitária em vários países, indicando um risco potencial para a saúde global (Bostanghadiri et al, 2023) (Subissi et al, 2022).

Essas experiências anteriores com o SARS-CoV, MERS-CoV e, mais recentemente, o SARS-CoV-2 demonstram que, mesmo após o fim oficial de uma emergência,

a vigilância constante e a preparação são cruciais para mitigar o risco de futuras epidemias. O surgimento do SARS-CoV-2, com uma taxa de transmissão significativamente mais elevada, resultou em uma pandemia global sem precedentes, que sobrecarregou sistemas de saúde e causou profundas interrupções econômicas em todo o mundo. A pandemia de COVID-19 rapidamente se tornou um dos maiores desafios globais do século XXI, resultando em milhões de casos confirmados e mortes. Diante da gravidade dessa situação, torna-se imperativa a pesquisa contínua e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos capazes de controlar e, eventualmente, erradicar o vírus. Estudos recentes têm destacado a importância de novas abordagens terapêuticas não apenas para enfrentar a COVID-19, mas também para lidar com os impactos socioeconômicos de longo prazo, sublinhando a urgência de estratégias inovadoras para futuros surtos pandêmicos (Dube et al, 2021) (Hillen et al, 2020) (De et al, 2024) (Parsons & Acharya, 2023) (Spartalis et al, 2024).

Nesse contexto, os produtos naturais emergem como uma fonte promissora para a descoberta de novos fármacos, dada sua grande diversidade estrutural e histórico de uso terapêutico ao longo dos séculos. Muitos compostos bioativos de origem natural apresentam potentes atividades farmacológicas, incluindo propriedades antivirais, antimicrobianas e anti-inflamatórias, o que os torna candidatos relevantes para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra a COVID-19 e outras doenças emergentes.

Figura 1 - Número acumulado de casos de COVID-19 notificados à OMS no mundo, distribuídos por regiões geográficas. Cada círculo representa a quantidade de casos em cada local, com as cores correspondendo às diferentes regiões.



Fonte: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>, acessado em 24 de outubro de 2024.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. SARS-CoV-2 e Mecanismos de Infecção

O SARS-CoV-2 é um vírus pertencente à família Coronaviridae, sendo parte do gênero Betacoronavirus. Seu material genético consiste de uma molécula de RNA de fita simples com sentido positivo, com aproximadamente 30.000 pares de bases. Como outros coronavírus, o SARS-CoV-2 possui quatro principais proteínas estruturais: a proteína Spike (S), a proteína de membrana (M), a proteína do envelope (E) e a nucleocapsídeo (N), que encapsula o RNA viral (ver figura 2A) (Dube et al, 2021) (Arya et al, 2023).

A proteína Spike (S) desempenha um papel crucial na infectividade do vírus, mediando a entrada nas células hospedeiras ao se ligar ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) nas células humanas. Ela é composta por duas subunidades principais: a S1, responsável pela ligação ao receptor, e a S2, que facilita a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. A proteína S é um dos principais alvos terapêuticos e vacinais, devido à sua importância no processo de infecção (ver figura 2B) (Amiral & Seghatchian, 2023) (Mannar et al, 2022).

Além das proteínas estruturais, o genoma do vírus codifica várias proteínas não estruturais, como a protease principal (3CLpro) (Huff et al, 2022), que é essencial para a clivagem de poliproteínas virais durante a replicação, e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que catalisa a replicação do RNA viral (ver figura 2C).

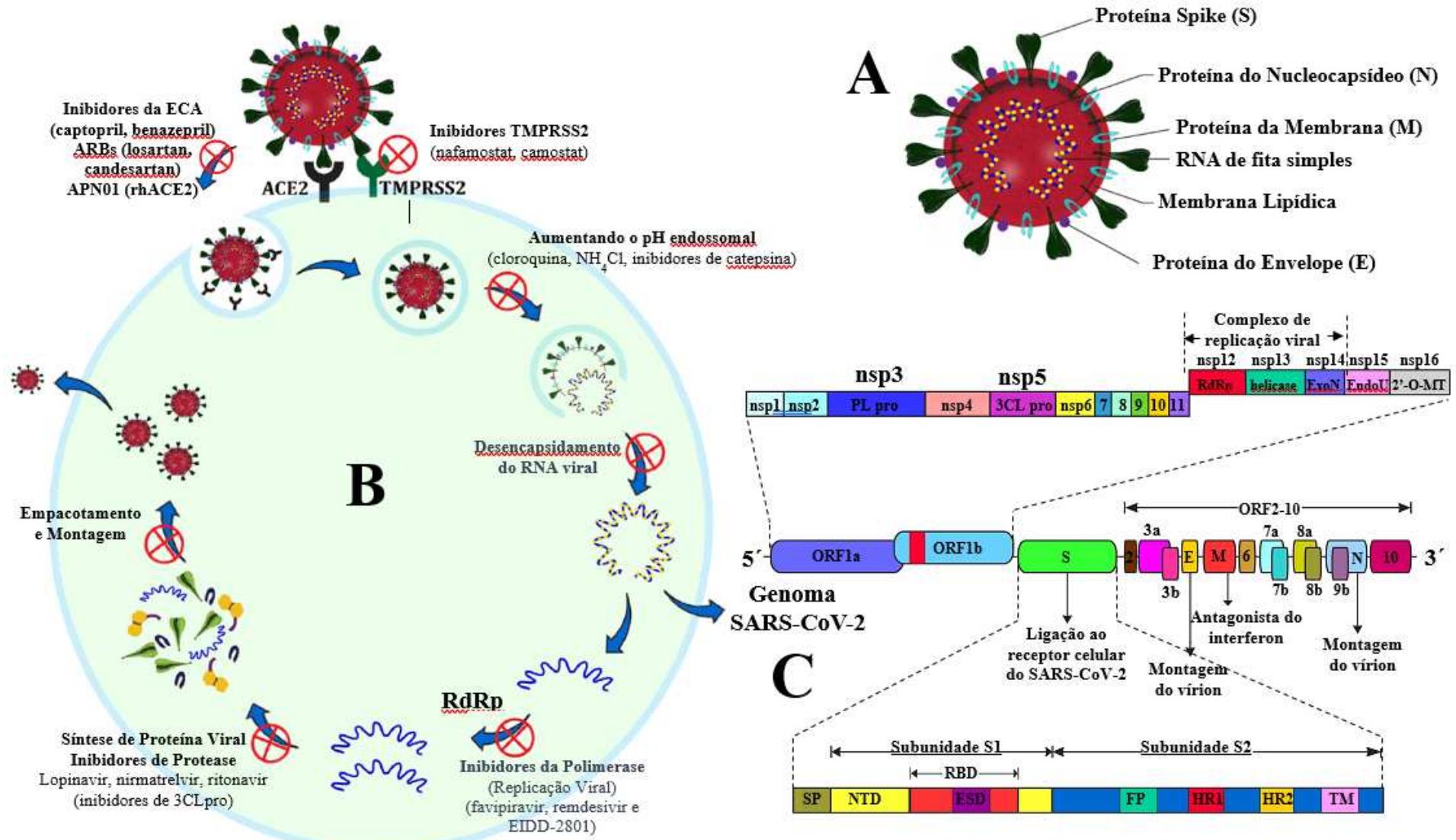
Entre os mecanismos de inibir o vírus no organismo infectado, podemos citar:

- I. Inibidores da proteína Spike (S): A proteína Spike é um dos principais alvos terapêuticos por facilitar a entrada do vírus nas células humanas através da ligação ao receptor ACE2. Diversos compostos têm sido estudados com o objetivo de bloquear essa interação. Um exemplo significativo é a mefloquina, que tem mostrado potencial como inibidor da Spike, especialmente em variantes como a Ômicron, que apresenta múltiplas mutações na região de ligação ao receptor (RBD). Estudos indicam que a mefloquina inibe a interação entre a Spike e o ACE2, dificultando a entrada do vírus na célula hospedeira (Gaynor et al, 2023) (Xu et al, 2022).
- II. Inibidores da TMPRSS2: Além de se ligar ao ACE2, a Spike precisa ser clivada pela enzima transmembranar TMPRSS2 para que a fusão viral com a célula hospedeira ocorra. Nafamostat e Camostat são dois inibidores dessa protease que mostraram

- eficácia ao bloquear a ativação da Spike, prevenindo a fusão da membrana viral com a membrana da célula (NURCAHYANINGTYAS et al, 2023).
- III. Inibidores que alteram o pH endossomal: Durante o processo de infecção, o SARS-CoV-2 também depende de um pH endossomal mais baixo para entrar nas células. Agentes como Cloroquina e NH₄Cl interferem nesse processo ao aumentar o pH endossomal, dificultando a fusão viral e, consequentemente, a entrada do vírus na célula. Além disso, inibidores de catepsina têm sido investigados por sua capacidade de inibir a clivagem viral no endossoma (Dube et al, 2021).
 - IV. Inibidores da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp): Uma vez dentro da célula, o RNA viral é replicado pela RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). Inibidores como Favipiravir, remdesivir e EIDD-2801 mostraram ser eficazes em interromper a replicação do RNA viral, bloqueando esse passo essencial na multiplicação do vírus (Yin et al, 2020).
 - V. Inibidores da protease 3CLpro (Mpro): A 3CLpro é uma protease crucial para a clivagem de poliproteínas virais, permitindo a produção de proteínas funcionais do vírus. O Paxlovid, que combina nirmatrelvir e ritonavir, tem sido um dos tratamentos mais promissores, atuando diretamente na inibição dessa protease. Ao bloquear a 3CLpro, o Paxlovid impede a formação de proteínas virais maduras, interrompendo a replicação do vírus. Este composto mostrou-se altamente eficaz, sendo um dos principais tratamentos orais disponíveis para COVID-19, especialmente em casos leves a moderados, ajudando a reduzir a carga viral e o risco de hospitalização (Alvarado et al, 2022) (Dai et al, 2020) (Giudetti et al, 2022) (Burki, 2022) (Dawood, 2023) (De et al, 2024) (Gao et al, 2021) (Jin et al, 2020) (Ower et al, 2021) (Martens-Lobenhoffer et al, 2022) (Santos & Valentini, 2024).
 - VI. Inibidores da montagem e empacotamento viral: Na fase final do ciclo de vida do SARS-CoV-2, o vírus precisa montar e empacotar suas novas partículas virais para serem liberadas da célula hospedeira. Compostos como Lopinavir e ritonavir, que são inibidores de proteases, têm mostrado eficácia em bloquear essa etapa, impedindo que novas partículas virais sejam formadas e liberadas para infectar outras células (BUXERAUD et al, 2022).

Esses compostos, atuando em diferentes fases do ciclo replicativo do vírus, formam uma linha de defesa promissora contra a COVID-19 e suas variantes. A combinação dessas terapias tem sido uma estratégia eficaz para reduzir a gravidade da infecção, impedir a propagação do vírus e prevenir complicações graves em pacientes infectados.

Figura 2 - Estrutura e ciclo replicativo do SARS-CoV-2: (A) Estrutura do vírus (B) Ciclo de infecção e replicação viral. (C) Organização do genoma do SARS-CoV-2.



Fonte: Dube et al, 2021, com adaptações.

2.2. Diterpenoides Ictexanos: Propriedades e Aplicações Terapêuticas

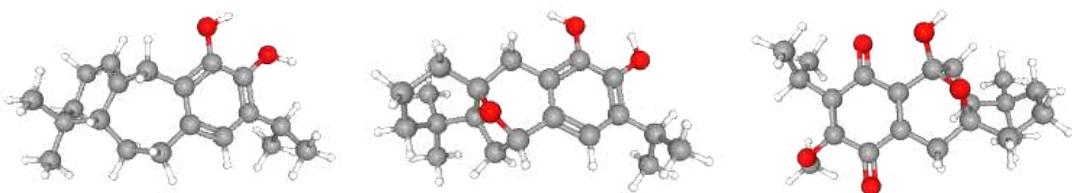
Os diterpenos são compostos naturais constituídos por 20 átomos de carbono, derivados de quatro unidades de isopreno, e podem ser encontrados em diversas plantas de diferentes famílias botânicas. Um exemplo marcante é a família Lamiaceae, onde ocorrem em gêneros como *Salvia* e *Plectranthus*, incluindo espécies como *Plectranthus barbatus* (sinônimo: *Coleus forskohlii*) e *Salvia apiana*, entre outras (Nieto et al, 2000). Embora os diterpenos sejam formalmente definidos como hidrocarbonetos, as estruturas que contêm heteroátomos ou grupos funcionais são denominadas diterpenoides. Apesar dessa distinção técnica, os dois termos são frequentemente usados de forma intercambiável na literatura científica. Esses compostos apresentam uma diversidade estrutural significativa e são amplamente encontrados em plantas, corais, algas, fungos e outros organismos. Os diterpenoides, em particular, destacam-se por sua rica farmacologia e incluem compostos bioativos importantes, como o retinol (vitamina A), o fitol (precursor de clorofilas) e o taxadieno (precursor do taxol, um medicamento anticâncer) (Wardana et al, 2021) (Naeini et al, 2022) (Okayama et al, 2023).

Entre os diterpenoides, os icetexanos possuem destaque devido à sua complexa estrutura tricarbocíclica 6-7-6 e às diversas atividades biológicas que exibem. Esses compostos, majoritariamente isolados de plantas terrestres, apresentam propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antiparasitárias. Desde a descoberta do primeiro icetexano, o icetexone, em 1976, mais de 100 compostos dessa subclasse foram identificados, reforçando seu potencial como estruturas modelo para o desenvolvimento de novos fármacos (Jiang et al, 2016) (Kang et al, 2022) (Suto et al, 2017).

Estudos indicam que os icetexanos são formados por rearranjos enzimáticos no esqueleto dos abietanos, outro grupo de diterpenoides, o que resulta em suas estruturas únicas e funcionalizações específicas. Três produtos naturais dessa subclasse possuem relevância central neste estudo: barbatusol, brussonol e komaroviquinona (ver figura 3). O barbatusol, isolado de espécies como *Coleus barbatus*, é conhecido por sua atividade antioxidante e foi um dos primeiros icetexanos a estabelecer experimentalmente a relação biossintética com os abietanos. O brussonol, também derivado de plantas do gênero *Salvia*, apresenta propriedades anti-inflamatórias e potencial antiviral. Por sua vez, a komaroviquinona, isolada de espécies como *Salvia officinalis*, destaca-se por sua atividade antiparasitária, além de seu potencial como inibidor de proteínas virais essenciais ao ciclo replicativo do SARS-CoV-2 (UCHIYAMA et al, 2003). Esses compostos apresentam diversos grupos funcionais – entre eles hidroxilos, carbonilas e anéis aromáticos substituídos – que podem influenciar significativamente sua

atividade biológica. As hidroxilas, por exemplo, estão frequentemente associadas a efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, enquanto as carbonilas podem interagir com alvos moleculares específicos, favorecendo ações antitumorais ou antimicrobianas. Além disso, a presença de anéis aromáticos funcionalizados facilita a formação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, o que pode potencializar a afinidade dos compostos a enzimas e receptores celulares. Esses fatores estruturais combinados tornam esses diterpenos promissores na busca de novos fármacos para o tratamento de doenças como câncer, inflamações crônicas e infecções microbianas (Jiang et al, 2016) (Kang et al, 2022) (Suto et al, 2017).

Figura 3 – Estruturas moleculares em 3D dos compostos barbatusol, brussonol e komaroquinona (da esquerda para a direita).



Fonte: elaborada pelo autor.

Embora os diterpenoides icetexanos sejam predominantemente isolados de plantas terrestres, avanços na química sintética têm permitido sua produção em laboratório, ampliando significativamente o acesso a essas moléculas complexas. Com estruturas tricarbocíclicas únicas e propriedades biológicas notáveis, esses compostos têm sido sintetizados por meio de abordagens inovadoras, como reações de abertura de epóxidos catalisadas por níquel, ciclações Friedel-Crafts e rearranjos biomiméticos (Suto et al, 2010). Essas estratégias não apenas superam as limitações da disponibilidade natural, mas também permitem a criação de análogos estruturais com potenciais farmacológicos expandidos. Assim, a síntese química moderna não só complementa, mas também expande o potencial dos diterpenoides icetexanos como modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais, anticancerígenos e antiparasitários, destacando sua relevância tanto no campo da química quanto no das ciências biomédicas (Ahmad et al, 2019) (Suto et al, 2017) (Oh et al, 2016) (Okayama et al, 2023) (Uchiyama et al, 2005).

2.3. Ferramentas para Caracterização de Sítios de Ligação

Antes de iniciar qualquer estudo *in silico* que envolva a interação entre uma proteína e um ligante, é imprescindível realizar uma análise detalhada e rigorosa do sítio de ligação. A identificação precisa do local de interação é um passo crucial, pois influencia diretamente a confiabilidade de métodos subsequentes, como docking molecular e simulações de dinâmica molecular. Essa análise pode ser realizada por meio de ferramentas computacionais disponíveis em servidores especializados, cada uma com metodologias específicas para a detecção e caracterização de sítios de ligação. Além disso, a validação dos resultados com base em dados experimentais ou revisões da literatura científica é indispensável, pois permite confirmar as previsões computacionais e estabelecer uma base sólida para os estudos. A comparação entre os resultados obtidos pelas ferramentas computacionais e as informações da literatura fortalece a fundamentação científica do sítio de ligação, aumentando a robustez e a aplicabilidade dos resultados em contextos farmacológicos e biomédicos.

O GRaSP (Graph-based Residue Neighborhood Strategy to Predict binding sites, <https://grasp.ufv.br/>) é uma ferramenta inovadora desenvolvida para identificar sítios de ligação em proteínas de maneira eficiente e escalável. Seu diferencial reside na modelagem do ambiente de cada resíduo da proteína como um grafo, utilizando propriedades topológicas e físico-químicas dos átomos e suas interações não covalentes. Essa abordagem possibilita a caracterização detalhada dos resíduos e seus vizinhos próximos (primeira e segunda camadas de interação), fornecendo informações essenciais sobre o ambiente estrutural da proteína (Santana et al, 2020).

Diferentemente de métodos tradicionais baseados em alinhamento de sequências ou superposição estrutural, o GRaSP utiliza aprendizado supervisionado para treinar classificadores capazes de prever se um resíduo faz parte de um sítio de ligação. O modelo é alimentado por um conjunto de descritores, como acessibilidade relativa ao solvente, propriedades atômicas (hidrofobicidade, carga elétrica, capacidade de doar ou aceitar ligações de hidrogênio, entre outros) e tipos de interações não covalentes (como pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas). Essas informações são processadas e representadas em um vetor de características que descreve o ambiente local de cada resíduo (Santana et al, 2022).

Além de sua precisão elevada, o GRaSP destaca-se por sua rapidez, sendo capaz de analisar grandes conjuntos de dados em questão de segundos, enquanto métodos concorrentes podem levar horas. Ele também é eficaz na previsão de sítios de ligação em proteínas

multiméricas e estruturas com ou sem ligantes previamente associados, o que amplia significativamente sua aplicabilidade em estudos biomédicos e farmacológicos.

Essa ferramenta representa um avanço significativo na área de bioinformática estrutural, fornecendo previsões confiáveis de sítios de ligação que podem ser integradas à pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos ou estudos de funcionalidade proteica. Com o GRaSP, é possível obter insights detalhados sobre interações proteína-ligante, otimizando o tempo e os recursos envolvidos nos estudos computacionais.

O ProBiS (Protein Binding Sites, <http://probis.cmm.ki.si/>) é uma ferramenta altamente eficiente para detecção de sítios de ligação em proteínas, baseada na similaridade estrutural entre proteínas. Ele utiliza um algoritmo inovador para identificar regiões similares em diferentes estruturas proteicas, independentemente da homologia de sequência ou do dobramento global da proteína. Essa abordagem permite que o ProBiS detecte sítios de ligação conservados evolutivamente e faça previsões robustas mesmo entre proteínas com baixa similaridade geral (Konc et al, 2015).

A metodologia do ProBiS baseia-se na comparação local de superfícies proteicas, onde cada sítio de ligação é tratado como um grafo tridimensional. O algoritmo aplica uma análise de clique máximo para identificar subestruturas conservadas que indicam possíveis locais de ligação. Esses sítios são então superpostos com base em critérios geométricos e físico-químicos, permitindo que ligantes previamente associados a outras proteínas sejam transpostos para a proteína de interesse. O sistema ainda atribui uma pontuação de similaridade (Z-score) para cada correspondência, ajudando a validar e classificar os sítios preditos.

O ProBiS é amplamente utilizado em estudos de docking molecular e desenvolvimento de fármacos, especialmente em situações em que as estruturas cristalográficas de proteínas com ligantes co-cristalizados (holoproteínas) estão indisponíveis. Ele é capaz de identificar ligantes potenciais e prever a sua posição em proteínas em estado apo (sem ligantes). Além disso, sua integração com ferramentas como o CHARMM permite a otimização das geometrias preditas, minimização de energia e cálculo de interações proteína-ligante, o que aumenta ainda mais a confiabilidade dos modelos gerados. Focando na similaridade estrutural, oferece uma solução robusta para prever interações proteína-ligante, destacando-se como ferramenta essencial para análises *in silico* em bioinformática e descoberta de fármacos.

O COACH (Consensus-based Annotation of protein-ligand binding sites, <https://zhanggroup.org/COACH/>) é uma ferramenta de previsão de sítios de ligação que se destaca por integrar diferentes métodos complementares para maximizar a precisão e a confiabilidade das previsões. Desenvolvido com o objetivo de superar as limitações de métodos

individuais, o COACH combina os resultados de cinco abordagens avançadas: TM-SITE e S-SITE (estritamente estruturais e baseadas em perfis de sequência, respectivamente), além de COFACTOR, FINDSITE e ConCavity, métodos amplamente validados na bioinformática estrutural (Yang et al, 2013).

A principal inovação do COACH está na utilização de um modelo de aprendizado supervisionado baseado em Máquinas de Vetores de Suporte (SVM). Este modelo sintetiza as predições individuais de cada método em uma única predição consensual, permitindo a integração de diferentes aspectos estruturais e funcionais. Para isso, o COACH considera fatores como a similaridade estrutural local e global, alinhamento de perfis de sequência e características das cavidades identificadas. Os resultados individuais de cada ferramenta são ponderados e utilizados como vetores de entrada no treinamento do modelo, garantindo que o método aproveite ao máximo os pontos fortes de cada abordagem.

Ao fornecer a sequência ou a estrutura tridimensional de uma proteína, o COACH analisa a informação disponível e gera predições altamente confiáveis. Quando a sequência é fornecida, o método S-SITE realiza a predição com base em alinhamentos de perfis de sequência no banco de dados BioLiP. Para estruturas tridimensionais, todos os métodos são combinados para identificar sítios de ligação com alta confiança, apresentando uma lista ranqueada de possíveis ligantes e seus respectivos resíduos de ligação (Yang et al, 2013).

Os resultados do COACH são amplamente validados, demonstrando desempenho significativamente superior em relação a métodos individuais em experimentos de benchmark, como o CASP e o CAMEO. Além disso, a ferramenta é robusta em cenários onde a qualidade da estrutura de entrada é baixa, um desafio comum em modelos computacionais. Com sua abordagem integrada, o COACH se estabelece como uma solução poderosa e confiável para a predição de sítios de ligação em proteínas, oferecendo suporte essencial para a anotação funcional de proteínas e o desenvolvimento de novos fármacos.

2.4. Triagem Virtual de Compostos Bioativos

A triagem virtual é uma técnica computacional que desempenha um papel fundamental na identificação de compostos bioativos com potencial terapêutico. Essa abordagem permite a avaliação sistemática de grandes bibliotecas de compostos químicos, priorizando aqueles mais promissores para interação com alvos biológicos específicos, como proteínas. A triagem virtual é amplamente utilizada no desenvolvimento de fármacos,

reduzindo significativamente os custos e o tempo envolvidos nos processos iniciais de descoberta (Chaudhuri et al, 2012) (Ji et al, 2023) (Ross et al, 2013).

Essa metodologia baseia-se principalmente em dois enfoques: triagem baseada em estrutura e triagem baseada em ligantes. Na abordagem baseada em estrutura, a triagem utiliza a estrutura tridimensional da proteína-alvo para identificar compostos que se ajustem aos seus sítios de ligação, levando em consideração fatores como complementaridade geométrica, energética e físico-química. Já na abordagem baseada em ligantes, a triagem é guiada por informações de compostos conhecidos, com propriedades bioativas semelhantes, utilizando descritores moleculares e alinhamento de estruturas para inferir potenciais ligantes (Alamri et al, 2020).

Entre as ferramentas mais comuns empregadas na triagem virtual, destacam-se softwares como AutoDock, Molecular Operating Environment (MOE), Glide e GOLD, que realizam simulações detalhadas de acoplamento molecular (docking). Essas ferramentas avaliam a afinidade de ligação entre os compostos candidatos e o alvo, classificando-os com base em pontuações que refletem a estabilidade das interações previstas.

Além disso, a triagem virtual pode ser aprimorada por meio da integração com outros métodos computacionais, como a dinâmica molecular e a química quântica, que permitem validar e refinar as previsões iniciais. Também é comum o uso de triagem virtual em combinação com análises ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), garantindo que os compostos priorizados não apenas apresentem alta afinidade de ligação, mas também sejam seguros e viáveis em estudos pré-clínicos e clínicos.

No contexto deste trabalho, a triagem virtual foi essencial para a seleção de compostos bioativos capazes de interagir com proteínas do SARS-CoV-2, como a proteína 3CLpro e Spike. A aplicação rigorosa dessa abordagem permitiu priorizar compostos como barbatusol, brussonol e komaroviquinona, que demonstraram alta afinidade de ligação e estabilidade nos sítios ativos dessas proteínas, destacando-se como candidatos promissores para o desenvolvimento de terapias antivirais. Essa estratégia reforça a eficiência da triagem virtual na descoberta de compostos com elevado potencial terapêutico.

2.5. Análise de Interações por Docking Molecular

Docking molecular é uma técnica computacional essencial no estudo das interações entre moléculas pequenas (ligantes) e macromoléculas biológicas (receptores, como proteínas). Essa abordagem visa prever a orientação, a posição e a afinidade de um ligante dentro do sítio

de ligação do receptor, simulando o processo de reconhecimento molecular que ocorre em sistemas biológicos. A relevância do docking molecular reside em sua capacidade de elucidar mecanismos moleculares de interação, identificar novos compostos bioativos e auxiliar no desenvolvimento de fármacos (Ali et al, 2021) (Lee & Sun, 2007)(Morris et al, 2009) (Yang et al, 2021).

O procedimento de docking molecular utiliza dois elementos principais: um algoritmo de busca para explorar as diversas orientações e conformações possíveis do ligante e uma função de avaliação para estimar a energia de interação entre o ligante e o receptor. A função de avaliação combina termos energéticos, como interações eletrostáticas, forças de van der Waals e desidratação, para fornecer uma estimativa da estabilidade do complexo ligante-receptor. Softwares como AutoDock e AutoDock Vina são amplamente utilizados nessa área devido à sua precisão e eficiência. Esses programas implementam algoritmos, como o algoritmo genético Lamarckiano e métodos de busca estocástica, para explorar o espaço conformacional do ligante e identificar as poses mais estáveis (Morris et al, 1998) (Trott et al, 2010).

Uma característica importante do docking molecular é a flexibilidade. Muitos métodos tratam o receptor como rígido, enquanto o ligante é considerado flexível, permitindo a rotação em torno de suas ligações. No entanto, avanços recentes, como o AutoDock4, possibilitam a modelagem de flexibilidade em regiões selecionadas do receptor, como cadeias laterais de resíduos no sítio de ligação, o que aumenta a precisão das previsões para sistemas com movimento significativo do receptor durante a ligação.

Além disso, o docking molecular não é apenas uma técnica isolada, mas também parte de processos estruturados mais amplos em estudos de descoberta de fármacos. Após a identificação de possíveis ligantes, os resultados do docking podem ser validados e refinados com simulações de dinâmica molecular e cálculos de química quântica. Isso permite a análise detalhada de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio, interações π - π e pontes salinas, fornecendo informações críticas para o desenho racional de fármacos.

Neste trabalho, o docking molecular foi empregado para investigar as interações de compostos bioativos, como barbatusol, brussonol e komaroviquinona, com proteínas-chave do SARS-CoV-2, 3CLpro e Spiker. A técnica permitiu identificar ligantes com alta afinidade e estabilidade, destacando novos candidatos terapêuticos para a COVID-19. O método é essencial na interface entre biologia estrutural e descoberta de fármacos (Chen et al, 2022).

2.6. Simulações de Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica computacional utilizada para investigar o comportamento de sistemas moleculares ao longo do tempo. Baseando-se nos princípios da mecânica clássica, a DM calcula o movimento de átomos e moléculas por meio da integração das equações de Newton, considerando forças geradas por potenciais interatônicos. Essas simulações fornecem uma visão detalhada e dinâmica de sistemas biológicos, químicos e materiais, permitindo a análise de fenômenos que ocorrem em escalas de tempo nanométricas a microsegundos (Adjoua et al, 2021) (Lemkul & Bevan, 2010) (Lemkul & Bevan, 2012) (Zhang et al, 2024).

O principal objetivo da DM é compreender como moléculas interagem em diferentes condições, desde sistemas simples, como solventes, até estruturas complexas, como proteínas, ácidos nucleicos e membranas celulares. Utilizando campos de força predefinidos, como AMBER, CHARMM, OPLS ou GROMOS, a dinâmica molecular consegue calcular propriedades físicas e químicas dos sistemas moleculares. Esses campos de força são, na prática, conjuntos de arquivos armazenados no software, contendo parâmetros e constantes que descrevem as interações entre os átomos. Eles fornecem informações essenciais para os cálculos, como a energia necessária para esticar ou comprimir ligações químicas, ajustar ângulos entre átomos conectados, e permitir ou restringir torções ao redor de ligações. Além disso, os campos de força incluem parâmetros para modelar interações não ligadas, como forças de van der Waals, que dependem da proximidade entre os átomos, e interações eletrostáticas, que resultam de cargas parciais nos átomos. Esses parâmetros servem como base para que o software calcule com precisão a energia total do sistema, permitindo prever propriedades como energias de ligações, estabilidade conformacional e os mecanismos moleculares de interação (Case et al, 2023) (Duan et al, 2003) (Jorgensen et al, 1988) (Lindorff-Larsen et al, 2010).

A DM tem aplicações diversas, desde o estudo de mecanismos bioquímicos até o desenvolvimento de fármacos. No campo da bioinformática estrutural, é amplamente empregada para avaliar a flexibilidade de proteínas, prever conformações estáveis de complexos proteína-ligante e investigar os efeitos de mutações. Além disso, é frequentemente utilizada para validar predições feitas por docking molecular, refinando os modelos gerados e permitindo uma análise mais detalhada das interações intermoleculares.

Ferramentas como GROMACS, AMBER e NAMD são amplamente utilizadas em simulações de dinâmica molecular, permitindo cálculos de grande escala e algoritmos

avançados. A técnica é essencial na interface entre biologia computacional, química teórica e ciência dos materiais.

Para a estimativa da energia de ligação entre a proteína e seus ligantes ao longo das simulações de dinâmica molecular, foi utilizado o método MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area), implementado na ferramenta gmx_MMPSA (Miller et al, 2012). Esse método combina mecânica molecular com cálculos de energia livre baseados na solução da equação de Poisson-Boltzmann, permitindo a quantificação da contribuição das interações eletrostáticas, van der Waals e da solvação na estabilidade do complexo proteína-ligante (Olsen et al, 2019). O gmx_MMPSA, integrado ao GROMACS, facilita a análise de interações moleculares ao longo do tempo, oferecendo uma abordagem robusta para a predição da afinidade de ligação e auxiliando na identificação de potenciais inibidores com alto potencial terapêutico (Valdés-Tresanco et al, 2021).

Os métodos híbridos QM/MM (mecânica quântica/mecânica molecular) representam uma das abordagens mais avançadas e flexíveis para estudar sistemas moleculares complexos. Essa metodologia permite combinar a precisão dos cálculos de mecânica quântica (QM), necessários para descrever eventos eletrônicos, com a eficiência computacional da mecânica molecular (MM), que simula o comportamento de regiões maiores do sistema, como solventes ou ambientes proteicos. Essa divisão de trabalho torna o QM/MM uma ferramenta indispensável para investigações que envolvem eventos reativos em contextos biológicos e químicos (Giudetti et al, 2022).

No nível quântico (QM), métodos como a Teoria do Funcional da Densidade (DFT) e métodos pós-Hartree-Fock são utilizados para descrever com precisão processos eletrônicos, como quebra e formação de ligações químicas, bem como reações enzimáticas em sítios ativos de proteínas. No nível molecular (MM), campos de força clássicos, como AMBER ou CHARMM, são empregados para modelar as interações no restante do sistema, incluindo forças de van der Waals, interações eletrostáticas e movimentação de átomos distantes. Essa integração entre os dois níveis é feita por meio de técnicas de acoplamento eletrostático, que considera a polarização mútua entre a região quântica e a região molecular, garantindo que as interações sejam fisicamente consistentes (Govindasamy et al, 2021).

Uma característica marcante do QM/MM é sua capacidade de adaptação a diferentes tipos de sistemas. Por exemplo, em estudos enzimáticos, a região quântica é frequentemente limitada ao sítio ativo e aos resíduos diretamente envolvidos na reação, enquanto o restante da proteína, o solvente e outras moléculas são tratados pelo método clássico. Isso permite explorar fenômenos em sistemas de milhares de átomos, como as interações

proteína-ligante ou os mecanismos de catálise enzimática, mantendo um custo computacional manejável.

Ferramentas modernas como MiMiC, CP2K e ONIOM aprimoram ainda mais o desempenho dos métodos QM/MM, implementando estratégias de paralelização que permitem explorar sistemas maiores e escalas de tempo mais longas. O framework MiMiC, por exemplo, emprega acoplamentos flexíveis entre programas especializados (como CPMD para cálculos quânticos e GROMACS para simulações moleculares), permitindo a análise de sistemas complexos com alta eficiência. Essas inovações tornaram possível simular eventos dinâmicos, como a reorganização de proteínas em membranas celulares, em tempos que alcançam nanosegundos, o que antes era impraticável (Tjornhammar, 2010).

No contexto da bioquímica computacional, os métodos QM/MM têm sido amplamente aplicados para investigar interações proteína-ligante, mecanismos de inibição enzimática e processos reativos em ambientes biológicos. Por exemplo, em estudos relacionados ao SARS-CoV-2, o QM/MM foi usado para descrever a inibição de proteínas virais por ligantes bioativos, permitindo prever as características eletrônicas e conformacionais que contribuem para a eficácia de potenciais fármacos (Saravanan et al, 2019).

Em suma, os métodos QM/MM combinam precisão e eficiência, permitindo explorar sistemas de grande escala com nível de detalhe molecular. Suas aplicações abrangem desde a química teórica e ciência dos materiais até a biologia estrutural e descoberta de medicamentos, posicionando essa abordagem como um pilar essencial da simulação computacional moderna. Ferramentas avançadas e a contínua evolução em algoritmos de acoplamento e paralelização continuarão a expandir as fronteiras de sua aplicabilidade.

2.7. Aspectos ADMET e Ferramentas de Avaliação Computacional

Os aspectos relacionados à Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) desempenham um papel fundamental na avaliação da viabilidade de compostos bioativos como candidatos a fármacos. Essas propriedades são determinantes para o sucesso ou fracasso de uma molécula em ensaios clínicos, uma vez que influenciam diretamente sua eficácia terapêutica, segurança e perfil farmacocinético. A avaliação precoce e confiável de parâmetros ADMET é essencial para otimizar o desenvolvimento de novos medicamentos e minimizar custos e tempo no processo de descoberta.

Embora experimentos laboratoriais sejam tradicionalmente utilizados para medir propriedades ADMET, eles são frequentemente caros, demorados e nem sempre escaláveis para

grandes bibliotecas químicas. Nesse cenário, as abordagens computacionais têm se destacado como ferramentas indispensáveis. Servidores como o pkCSM foram desenvolvidos para prever propriedades ADMET de compostos químicos com base em assinaturas estruturais baseadas em grafos e aprendizado de máquina. Esses métodos combinam informações sobre propriedades físico-químicas gerais, farmacoforos, toxicoforos e padrões de distância entre átomos para gerar modelos preditivos de alta acurácia (Pire et al, 2015).

O pkCSM, especificamente, oferece uma plataforma integrada para prever propriedades como permeabilidade intestinal, solubilidade, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, toxicidade hepática e efeitos genotóxicos, entre outros. Suas previsões auxiliam na priorização de compostos e na identificação de modificações químicas que podem melhorar o perfil ADMET. Além disso, a ferramenta é acessível por meio de um servidor web, permitindo análises rápidas e em larga escala de bibliotecas químicas.

Neste trabalho, o pkCSM foi utilizado para avaliar os compostos barbatusol, brussonol, komarovquinona e nirmatrelvir, fornecendo informações cruciais sobre seu comportamento farmacocinético e toxicidade. A integração de métodos computacionais como o pkCSM com técnicas como docking molecular e dinâmica molecular reforça o papel das ferramentas *in silico* no desenvolvimento de fármacos modernos, permitindo uma abordagem mais racional e eficiente para a seleção de candidatos promissores.

2.8. Análise de Similaridade Molecular por Fingerprints

A análise de similaridade molecular utilizando fingerprints representa uma abordagem fundamental na química computacional para identificar padrões e semelhanças entre moléculas. As fingerprints são representações digitais de moléculas, codificadas como vetores binários ou numéricos, que capturam características estruturais e químicas. Esses vetores são derivados de propriedades específicas, como presença de grupos funcionais, átomos adjacentes ou conectividade molecular, permitindo comparações rápidas e eficientes entre compostos (Durant et al, 2002) (Rogers & Hahn, 2010).

No contexto da descoberta de fármacos, essa técnica é amplamente utilizada para avaliar a similaridade estrutural entre ligantes e compostos bioativos conhecidos. Ferramentas computacionais, como as disponíveis no RDKit, permitem gerar diferentes tipos de fingerprints, incluindo ECFP (Extended Connectivity Fingerprints) e MACCS, que são amplamente empregadas na triagem virtual de bibliotecas químicas e na priorização de candidatos a fármacos. O RDKit, por exemplo, oferece flexibilidade e robustez na criação e comparação

dessas representações, sendo uma ferramenta de código aberto amplamente adotada na comunidade científica (Landrum, 2024).

Neste trabalho, a análise de fingerprints foi utilizada para explorar a relação estrutural entre os compostos barbatusol, brussonol, komaroviquinona, nirmatrelvir, remdesivir e ritonavir. A comparação entre essas moléculas visou identificar similaridades que pudessem indicar mecanismos de ação compartilhados ou interações moleculares semelhantes com alvos biológicos, como as proteínas Spike e 3CLpro do SARS-CoV-2. Essa abordagem complementa técnicas como dinâmica molecular e docking, auxiliando na seleção de compostos promissores. Com ferramentas modernas e algoritmos avançados, a análise de fingerprints fortalece a química computacional na descoberta e desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos.

2.9. Estudo de Reatividade Molecular com Funções de Fukui

As funções de Fukui são ferramentas computacionais amplamente utilizadas na química teórica para investigar a reatividade molecular, permitindo a identificação de regiões em uma molécula que são mais propensas a interações químicas, como ataques nucleofílicos ou eletrofílicos. Desenvolvidas no contexto da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), essas funções avaliam a densidade eletrônica de fronteira (HOMO e LUMO), fornecendo insights sobre como uma molécula responde à adição ou remoção de elétrons (Maheswari et al, 2024) (Sales et al, 2021) (Sharma & Awasthj, 2021).

Matematicamente, as funções de Fukui são definidas como derivadas parciais da densidade eletrônica em relação ao número de elétrons, avaliadas em diferentes estados de oxidação da molécula. Isso permite calcular indicadores de reatividade local, como f^+ para ataques nucleofílicos, f^- para ataques eletrofílicos, e f^0 para reatividade radicalar. Essas informações são essenciais para compreender mecanismos de reação e prever comportamentos moleculares em processos químicos (Yang et al, 1986).

No contexto da descoberta de fármacos, as funções de Fukui são empregadas para analisar a reatividade de compostos bioativos e suas interações com alvos biológicos. Por exemplo, podem ser utilizadas para determinar os sítios reativos de ligantes em interações proteína-ligante, ajudando na otimização de compostos para maior seletividade e eficácia. Além disso, ferramentas como Orca e Gaussian são programas especializados na análise de densidade eletrônica e amplamente utilizados para calcular as funções de Fukui e visualizar regiões de reatividade molecular (Chandramohan et al, 2024) (Ramarajan et al, 2024) (Siziani et al 2025).

3. METODOLOGIA

O estudo teve início com uma triagem virtual, na qual foram baixadas aproximadamente 308 mil substâncias do banco de dados ZINC15. Após um extenso processo de análise e seleção dos compostos mais promissores, prosseguiu-se com a etapa de dinâmica molecular, na qual se obtiveram resultados satisfatórios para barbatusol, brussonol e komaroviquinona. Para fins de comparação, foram utilizados compostos de referência obtidos do banco de dados PubChem, permitindo avaliar a eficácia dos produtos naturais em relação aos padrões estabelecidos. Todos os estudos computacionais de triagem virtual, docking molecular, dinâmica molecular, QMMM e DFT foram realizados em um computador de aquisição própria, composto por uma placa-mãe Asus TUF Gaming x570-plus/BR, processador AMD Ryzen com 32 threads, 128 GB de memória RAM e placa de vídeo Zotac RTX 3070 Twin Edge.

3.1. Preparação dos Ligantes e das Estruturas Proteicas

As substâncias utilizadas neste estudo foram obtidas no banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), com ênfase nos compostos naturais barbatusol, brussonol e komaroviquinona, além dos compostos de referência nirmatrelvir e ritonavir, voltados para a inibição da protease 3CLpro, e mefloquina, para a proteína Spike. Esses ligantes foram otimizados minuciosamente utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), com o conjunto de bases B3LYP/6-311G**, por meio do software Orca 5.0.3. Esse processo de otimização gerou estruturas tridimensionais de alta precisão para os ligantes, facilitando análises detalhadas subsequentes, realizadas com o auxílio de softwares e servidores gratuitos, como Avogadro, Gabedit, Jmol e PyMOL (Allouche, 2011) (KIM et al, 2023) (Nesse et al, 2020) (Siziani et al 2025).

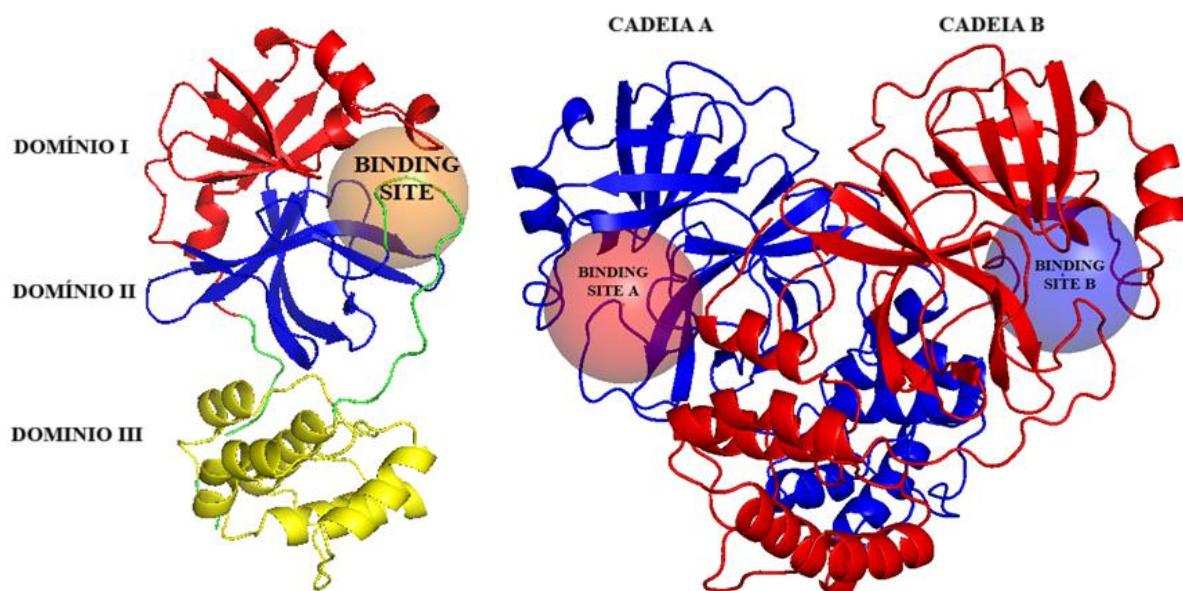
Adicionalmente, os NAGs e glicanos presentes na estrutura cristalográfica da proteína Spike foram otimizados utilizando o software Gabedit. Para tanto, empregou-se o campo de força AMBER, garantindo uma parametrização precisa e representações conformacionais adequadas. Essa etapa foi fundamental para assegurar a precisão das simulações envolvendo essas moléculas e suas interações com os ligantes estudados (Tekin, 2023) (Zhao et al, 2021) (Zhang et al, 2023).

A proteína Mpro do SARS-CoV-2 foi obtida do banco de dados Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), utilizando as estruturas com os códigos 6LU7 e 6M2Q, com

resoluções de 2,16 Å e 1,70 Å, respectivamente (shimamura et al, 2020) (Su et al, 2020). Para a estrutura 6LU7, foi selecionado o monômero, enquanto a estrutura 6M2Q foi empregada na forma de dímero (ver figura 4). A preparação das proteínas foi realizada no software PyMOL (versão 2.5.0), no qual moléculas de água, ligantes e heteroátomos foram removidos, preservando-se exclusivamente as proteínas de interesse. Posteriormente, ambas as estruturas foram protonadas para pH fisiológico utilizando o servidor Poisson-Boltzmann (<https://server.poissonboltzmann.org/>), que também realizou a otimização da rede de ligações de hidrogênio (Jurrus et al, 2018) (Yoosefian et al, 2023).

Adicionalmente, foi conduzido um estudo comparativo entre as interações moleculares do monômero e do dímero, visando identificar possíveis divergências nos perfis de interação com os ligantes. A proteína preparada foi submetida a simulações de 300 ns, e as estruturas coletadas nos tempos de 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ns foram utilizadas para docking molecular. A estrutura final de 300 ns foi selecionada para simulações adicionais de dinâmica molecular envolvendo os ligantes estudados (Gao et al, 2022).

Figura 4 - Representação comparativa das estruturas PDB ID 6LU7 e 6M2Q. À esquerda, a estrutura monomérica do PDB ID 6LU7 é representada, com o Domínio I destacado em vermelho (resíduos 8-101), o Domínio II em azul (resíduos 102-184) e o Domínio III em amarelo (resíduos 201-303). O sítio de ligação, localizado entre os Domínios I e II, está destacado em laranja. À direita, a estrutura dímera do PDB ID 6M2Q é ilustrada, com a Cadeia A em azul e a Cadeia B em vermelho, cada uma apresentando seus respectivos sítios de ligação.



Fonte: elaborada pelo autor.

Nesta pesquisa, foi empregada uma metodologia estruturada e abrangente de bioinformática para investigar a proteína Spike da variante SARS-CoV-2 Omicron BA.2. O processo iniciou-se com a seleção da estrutura da proteína Spike por meio do servidor CoV3D (<https://cov3d.ibbr.umd.edu/>), priorizando aquelas que atendiam a critérios específicos, como a associação à variante Omicron BA.2, e excluindo as estruturas vinculadas a anticorpos (Gowthaman et al, 2021). A estrutura selecionada, com ID 8D55, apresentava uma resolução de 2,8 Å. Para validação, o banco de dados RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) foi consultado, confirmando a estrutura e baixada no formato PDB, sendo a sequência de aminoácidos correspondente obtida no formato FASTA (Berman et al, 2000).

A modelagem da proteína foi conduzida na plataforma SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), onde a sequência de aminoácidos foi inserida para reconstruir o modelo baseado na estrutura 8D55 (Bienert et al, 2017) (Zhang et al, 2023). Após a modelagem, a estrutura foi protonada em pH fisiológico utilizando o servidor Poisson-Boltzmann (<https://server.poissonboltzmann.org/>), garantindo sua preparação para análises computacionais subsequentes. Essa estrutura foi posteriormente utilizada em simulações de docking molecular e dinâmica molecular, proporcionando insights detalhados sobre as interações e o comportamento molecular da proteína Spike.

A estrutura com ID 8D55 representa o estado fechado do trímero da proteína Spike da variante Omicron BA.2. Ela contém 51 ligantes, incluindo 21 unidades de 2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose (NAGs) e 30 glicanos (ver figura 5). O estado fechado foi selecionado devido à sua importância no estágio inicial de ligação ao receptor ACE2 e na fusão de membranas, processos críticos para a infectividade viral. Essa conformação também é mais estável e menos acessível aos anticorpos neutralizantes, tornando as interações moleculares mais desafiadoras e valiosas para o desenvolvimento de inibidores (Zhang et al, 2023).

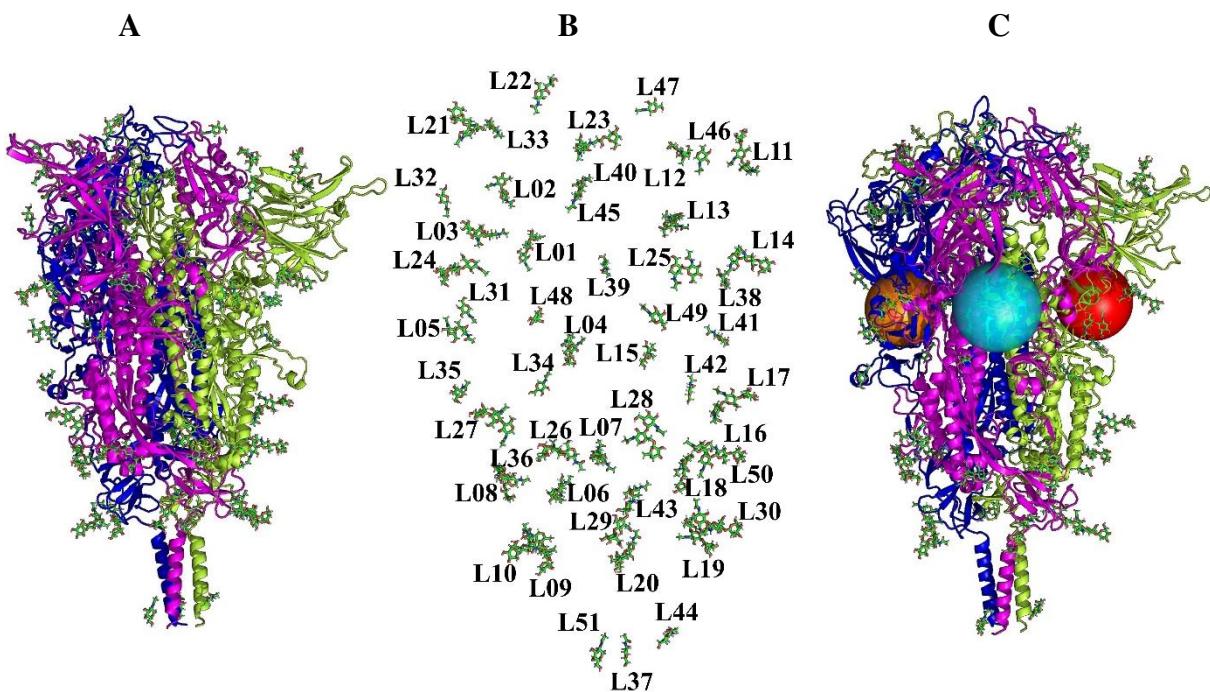
Entre os 51 ligantes, os 21 NAGs são identificados como L31, L32, L33, L34, L35, L36, L37, L38, L39, L40, L41, L42, L43, L44, L45, L46, L47, L48, L49, L50 e L51. Esses NAGs são unidades simples de açúcar. Os glicanos, por outro lado, são estruturas complexas compostas por múltiplas unidades de carboidratos, divididos em três grupos:

- I. 21 compostos de alfa-D-manopiranose-(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose-(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose, identificados como L01, L03, L04, L06, L07, L09, L10, L11, L13, L14, L16, L17, L19, L20, L21, L23, L24, L26, L27, L29 e L30.

- II. 6 compostos de 2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose-(1-4)-2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose, identificados como L02, L05, L12, L15, L22 e L25.
- III. 3 compostos de 2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose-(1-4)-[alfa-L-fucopiranose-(1-6)]-2-acetamido-2-desoxi-beta-D-glucopiranose, identificados como L08, L18 e L28.

Essa caracterização detalhada é essencial para compreender as propriedades estruturais da proteína Spike e suas interações moleculares, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de potenciais inibidores (Gapsys et al, 2020).

Figura 5 - Representação detalhada da proteína Spike Omicron BA.2 SARS-CoV-2 (PDB ID: 8D55). O painel A ilustra a proteína Spike em sua conformação trimérica, com as cadeias orientadas como na estrutura central. O painel B destaca as localizações dos ligantes, identificados por seus respectivos rótulos. O painel C apresenta os sítios de ligação reportados na literatura. As cadeias estão representadas em cores distintas: Cadeia A em azul, Cadeia B em verde-limão e Cadeia C em magenta. Os sítios de ligação são codificados por cores específicas: o da Cadeia A em laranja, o da Cadeia B em vermelho e o da Cadeia C em ciano. Essa representação fornece uma visualização clara e detalhada das regiões conformativas da proteína e dos locais de interação com os ligantes.



Fonte: elaborada pelo autor.

3.2. Caracterização dos Sítios de Ligação: GRaSP, ProBiS e COACH

Para a protease principal (Mpro) do SARS-CoV-2, foi utilizada uma abordagem criteriosa para identificar os sítios de ligação relevantes. O software GRaSP (<https://grasp.ufv.br/>) foi empregado como ferramenta principal, combinando análises estruturais e estatísticas para prever regiões potenciais de interação proteína-ligante (Santana et al, 2022). Além disso, os resultados obtidos foram validados e complementados com dados da literatura científica, que documentam sítios críticos previamente estudados para a Mpro. Essa combinação de métodos garantiu maior confiabilidade na definição dos sítios de interesse, que foram posteriormente explorados em estudos de docking molecular e dinâmica molecular.

Já para a glicoproteína Spike da variante Omicron BA.2 (PDB ID: 8D55), foi empregada uma metodologia avançada e rigorosa para investigar os sítios de ligação da sua forma trimérica. Essa estrutura foi escolhida por refletir melhor a conformação fisiológica da proteína viral, crucial para sua interação com o sistema imunológico e os receptores celulares do hospedeiro. Assim, a análise dos sítios de ligação foi realizada com três ferramentas complementares de bioinformática: ProBiS (<http://probis.cmm.ki.si/>), GRaSP (<https://grasp.ufv.br/>) e COACH (<https://zhanggroup.org/COACH/>), cada uma com abordagens distintas e complementares (Konc et al, 2015) (Yang et al, 2013).

Os sítios previstos por essas ferramentas foram cruzados e validados com informações documentadas na literatura científica, garantindo que as predições fossem consistentes e confiáveis. Essa abordagem abrangente permitiu identificar regiões críticas na proteína Spike para os ligantes mefloquina, brussonol e komaroviquinona, fornecendo uma base sólida para os estudos subsequentes de docking e dinâmica molecular.

3.3. Triagem Virtual, Docking Molecular e Dinâmica Molecular: Procedimentos e Parâmetros

Para a etapa inicial deste estudo, foi realizado um processo abrangente de triagem virtual envolvendo aproximadamente 308 mil compostos naturais. Essas substâncias foram obtidas do banco de dados ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>), uma plataforma amplamente utilizada para o acesso a bibliotecas químicas. Após o download, o arquivo contendo todas as substâncias foi processado utilizando o software Raccoon, que separou os compostos em arquivos individuais no formato PDBQT, garantindo a compatibilidade com as ferramentas de docking molecular (Sterling & Irwin, 2015).

A otimização das estruturas moleculares foi realizada com o software Open Babel (obabel), utilizando um script automatizado. Para isso, foi aplicado o campo de força GAFF (General AMBER Force Field), reconhecido por sua capacidade de modelar compostos orgânicos com precisão, permitindo a geração de conformações energicamente favoráveis para as substâncias (Case et al, 2023).

Paralelamente, as proteínas-alvo foram obtidas do banco de dados Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), incluindo a Mpro (PDB ID 6LU7), PLpro (PDB ID 6WX4), Spike (PDB ID 8D55) e RdRp (PDB ID 7BV2) (Starr et al, 2021). Cada estrutura foi preparada para os experimentos de docking molecular utilizando o software PyMOL, com a remoção de moléculas de água, ligantes co-cristalizados e heteroátomos. A preparação do grid box foi realizada com o software MGLTools 1.5.6, que definiu as coordenadas do sítio de ligação com base em informações estruturais e dados experimentais previamente reportados (Morris et al, 2009) (Rut et al, 2020).

A triagem virtual propriamente dita foi conduzida com o software AutoDock Vina, aplicando o grid box previamente configurado e realizando o docking molecular para os 308 mil compostos naturais. As energias de ligação de cada composto foram avaliadas, fornecendo uma medida preliminar da afinidade de cada substância pelas proteínas-alvo. Os compostos de referência, nirmatrelvir, ritonavir e mefloquina, apresentaram energias de ligação variando de -7 a -9 kcal/mol. Com base nesses resultados, aplicamos esse intervalo como critério inicial de seleção, priorizando substâncias que demonstraram energias de ligação equivalentes ou melhores para todas as quatro proteínas (Mpro, PLpro, Spike e RdRp).

Após a aplicação desse filtro inicial, foi realizada uma análise criteriosa da literatura para identificar compostos que já haviam sido investigados no contexto do SARS-CoV-2 (Gilson et al, 2016) (Liu et al, 2022) (Muratov et al, 2021) (Sun et al, 2021) (Tan & Verma, 2020) (Tassakka et al, 2021) (Wang et al, 2024) (Xu et al, 2023). Esse segundo filtro visou evitar redundâncias, concentrando os esforços em compostos ainda inexplorados. Como resultado desse processo de triagem e seleção, três substâncias naturais foram identificadas: barbatusol, brussonol e komaroviquinona, que não possuíam registros na literatura sobre seu potencial contra o SARS-CoV-2.

Esses compostos selecionados foram então submetidos a análises subsequentes, incluindo docking molecular detalhado, simulações de dinâmica molecular, estudos híbridos QM/MM, cálculos DFT, análises de reatividade molecular com funções de Fukui e predições de propriedades ADMET. O processo de triagem virtual, combinado com etapas rigorosas de

filtragem e validação, garantiu a escolha de substâncias promissoras e inovadoras para estudos aprofundados de inibição do SARS-CoV-2.

Para a realização das simulações de docking molecular, foram adotadas metodologias rigorosas para investigar as interações entre as proteínas-alvo do SARS-CoV-2 e os ligantes estudados. O trabalho focou nas proteínas Mpro (PDB ID: 6LU7 e 6M2Q) e Spike (PDB ID: 8D55), utilizando ferramentas computacionais avançadas e abordagens bem fundamentadas (Zhang et al, 2023).

Na preparação das proteínas, os arquivos foram processados com o MGLTools 1.5.6, uma ferramenta que permite a manipulação interativa de estruturas moleculares e a conversão para o formato PDBQT, compatível com o software AutoDock Vina. A preparação incluiu a remoção de moléculas de água, ligantes co-cristalizados e heteroátomos, além da protonação em pH fisiológico.

As simulações de docking molecular foram realizadas com o AutoDock Vina, um software amplamente reconhecido por sua eficiência e precisão. O processo começou com uma varredura global de toda a superfície proteica para identificar regiões de ancoragem em potencial. Posteriormente, refinamentos foram realizados focando nos resíduos críticos identificados nos sítios de ligação, garantindo maior precisão nos cálculos. Para o docking da Mpro, foi utilizada a identificação do sítio ativo com suporte do servidor GRaSP e validação com dados da literatura. Para a proteína Spike, os sítios foram definidos com o auxílio das ferramentas ProBiS, GRaSP e COACH, que previram resíduos conservados e funcionais, validados com informações científicas.

Os ligantes analisados incluíram barbatusol, brussonol, komaroviquinona, nirmatrelvir e mefloquina. A análise detalhada das interações intermoleculares foi realizada para avaliar forças estabilizadoras, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Essas interações foram visualizadas em PyMOL, que gerou representações tridimensionais dos complexos, e LigPlot, que produziu diagramas bidimensionais destacando os resíduos específicos envolvidos nas interações (Wallace et al, 1995).

Os resultados do docking molecular revelaram resíduos críticos nos sítios de ligação, localizados principalmente no domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike e nas regiões do sítio ativo da Mpro. As interações envolviam redes complexas de ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos, que contribuíram significativamente para a estabilidade dos complexos proteína-ligante. Além disso, as pontuações de docking foram cuidadosamente avaliadas, destacando as afinidades de ligação dos compostos estudados (Vivek-Ananth et al, 2020).

Para garantir uma análise detalhada e comparativa, foi criado um grid específico para cada posição dos NAGs e glicanos presentes na estrutura cristalográfica da proteína Spike, respeitando suas localizações originais e interações com os resíduos proteicos. As energias de afinidade e as interações dos NAGs e glicanos com a proteína foram medidas por meio de docking molecular, permitindo uma avaliação precisa de sua contribuição para a estabilidade do complexo. Esses dados foram utilizados como parâmetros de referência para comparar com os produtos naturais estudados, visto que os NAGs e glicanos desempenham papéis estruturais e funcionais importantes na proteína. A inclusão dessas análises comparativas fortaleceu a interpretação dos resultados, fornecendo um contexto biológico relevante para as interações e as afinidades de ligação dos compostos naturais investigados (Cao et al, 2021) (Grant et al, 2020) (Huang et al, 2020).

Ao final das análises, os resultados evidenciaram perfis únicos de interação para os compostos estudados, com destaque para os ligantes barbatusol, brussonol e komaroviquinona, que apresentaram interações promissoras, alinhadas às exigências terapêuticas. Essas informações oferecem uma base sólida para o desenvolvimento de potenciais inibidores contra o SARS-CoV-2, contribuindo para avanços na descoberta de medicamentos antivirais.

As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas com o objetivo de investigar o comportamento dinâmico das proteínas-alvo SARS-CoV-2, Mpro e Spike, em condições fisiológicas, assim como suas interações com os ligantes estudados. Essas simulações permitiram avaliar a estabilidade estrutural, os efeitos dos ligantes sobre as proteínas e as interações intermoleculares que contribuem para a estabilidade dos complexos formados (Holleringsworth & Dror, 2018)(Vijayakumar et al, 2022).

As simulações foram realizadas utilizando o software GROMACS 2022.5 com o campo de força AMBER99SB-ILDN, amplamente reconhecido por sua precisão na modelagem de proteínas e interações. O modelo de água TIP3P foi aplicado para representar os efeitos do solvente, garantindo a reprodução de condições biológicas realistas (Mark & Nilsson, 2001) (Pronk et al, 2013) (Valdés-Tresanco et al, 2021).

Antes das simulações, os ligantes foram otimizados e parametrizados utilizando as ferramentas Antechamber, parmchk2 e acpype, que geraram os parâmetros compatíveis com o campo de força AMBER e os adaptaram para uso no GROMACS (Case et al, 2023). A preparação das proteínas incluiu a remoção de moléculas de água, heteroátomos e ligantes co-cristalizados, seguida de protonação para refletir o pH fisiológico.

As simulações de dinâmica molecular seguiram um fluxo de trabalho em três etapas principais (Martyna et al, 1999):

- I. Minimização de energia: Eliminou interações desfavoráveis e ajustou a estrutura inicial para reduzir tensões e colisões estéricas.
- II. Equilíbrio NVT: Estabilizou a temperatura em 300 K, mantendo o número de partículas e o volume constantes.
- III. Equilíbrio NPT: Estabilizou a pressão em 1 bar, permitindo flutuações no volume e garantindo condições termodinâmicas realistas.

As simulações da Mpro foram realizadas inicialmente por 300 ns com a proteína solvatada em água. A estrutura final dessa simulação foi selecionada e usada para um segundo conjunto de simulações envolvendo o complexo proteína-ligante, onde cada ligante (nirmatrelvir, barbatusol, brussonol e komaroviquinona) foi acoplado ao sítio ativo da proteína para simulações adicionais de 100 ns. Para a proteína Spike, quatro simulações separadas de 100 ns foram conduzidas. A primeira incluiu o trímero completo associado aos seus 51 NAGs e glicanos, enquanto as três simulações subsequentes avaliaram a interação de cada monômero com os ligantes mefloquina, brussonol e komaroviquinona.

A análise dos dados de DM envolveu diversos parâmetros para compreender a estabilidade estrutural e as interações dos complexos proteína-ligante:

- RMSD (Desvio Quadrático Médio): Avaliou mudanças estruturais ao longo do tempo, indicando estabilidade ou alterações conformacionais.
- RMSF (Flutuação da Raiz Quadrada Média): Identificou regiões mais flexíveis ou estáveis na proteína, destacando os efeitos dos ligantes sobre resíduos específicos.
- Raio de Giro (Rg): Forneceu informações sobre a compactação da estrutura proteica e alterações durante a simulação.
- Distância mínima (mindist): Mediu a proximidade entre os átomos do ligante e os resíduos da proteína, avaliando a estabilidade das interações.
- Energia potencial: Indicou a estabilidade global do sistema, correlacionando a energia com as interações intermoleculares.

Os dados foram visualizados e analisados utilizando os softwares XMGrace, pymol e VMD (Humphrey et al, 1996).

3.4. Cálculos de Energia, QM/MM e DFT: Métodos e Aplicações

Para a estimativa da energia de ligação dos complexos proteína-ligante, foi empregado o método MM/PBSA utilizando o software gmx_MMPBSA, integrado ao GROMACS. Essa abordagem combina a Mecânica Molecular (MM) com os modelos de solvatação baseados em Poisson-Boltzmann (PB) ou Generalized Born (GB) e na área superficial acessível ao solvente (SASA). O método calcula a energia de ligação com base na seguinte expressão (Miller et al, 2012) (Olsen et al, 2019) (Valdés-Tresanco et al, 2021):

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}})$$

As contribuições energéticas avaliadas no cálculo incluem:

- I. Energia de van der Waals (VDWAALS): Representa as interações não ligadas de curto alcance entre átomos, essenciais para a estabilidade do complexo.
- II. Energia eletrostática (EEL): Descreve as interações eletrostáticas entre cargas parciais dos átomos, fundamentais para entender as afinidades ligante-proteína.
- III. Energia de solvatação polar (EGB): Calculada com base no modelo de Poisson-Boltzmann ou Generalized Born, representa a contribuição da polarização do solvente na estabilização do complexo.
- IV. Energia de solvatação apolar (ESURF): Associada à interação hidrofóbica, é proporcional à área de superfície acessível ao solvente (SASA), refletindo o custo energético para a solvatação de regiões apolares.
- V. Energia total na fase gasosa (GGAS): Soma das energias de van der Waals (VDWAALS) e eletrostática (EEL), representando a energia de interação do complexo no vácuo.
- VI. Energia total de solvatação (GSOLV): Soma das energias de solvatação polar (EGB) e apolar (ESURF), indicando a contribuição do solvente na estabilização do sistema.
- VII. Energia de ligação total (TOTAL): Combinação das energias na fase gasosa (GGAS) e de solvatação (GSOLV), representando a energia total de ligação entre a proteína e o ligante.

Os cálculos foram baseados nas trajetórias das simulações de dinâmica molecular previamente realizadas. Para isso, amostras representativas dos complexos foram selecionadas e processadas. Cada amostra foi decomposta nos estados proteína-ligante, proteína livre e ligante isolado, permitindo o cálculo das energias de cada componente e a posterior subtração para obter a energia de ligação.

O gmx_MMPBSA foi utilizado para calcular todas as contribuições de energia mencionadas, empregando os modelos de solvatação polar (Poisson-Boltzmann ou Generalized Born) e apolar (SASA). As energias foram computadas para cada quadro da trajetória, e os resultados médios foram utilizados para representar o comportamento geral do sistema (Miller et al, 2012) (Olsen et al, 2019) (Valdés-Tresanco et al, 2021).

Este procedimento permitiu uma análise detalhada das interações entre proteína e ligante, estabelecendo as bases para a compreensão da termodinâmica das interações moleculares.

Neste estudo, utilizamos a metodologia híbrida de mecânica quântica/mecânica molecular (QM/MM) para investigar o sistema de interesse, com foco em compreender detalhadamente as interações entre o ligante e os resíduos críticos do sítio de ligação da proteína-alvo. Para isso, empregamos o GROMACS 2022.5 com a interface integrada ao pacote CP2K 2022.2, que permite a realização de cálculos quânticos e a aplicação de forças adicionais QM/MM durante as simulações, garantindo uma integração robusta e eficiente (Wang & Gao, 2015).

Inicialmente, uma caixa periódica ortorrômbica de $10 \times 10 \times 10$ nm foi construída, e a topologia do sistema foi gerada utilizando o campo de força AMBER99SB-ILDN e o modelo de água TIP3P. A solvatação do sistema foi realizada, seguida pela neutralização com íons apropriados para equilibrar a carga global. Após essas etapas, o sistema passou por minimização de energia para eliminar tensões estruturais iniciais e por uma simulação de equilíbrio NVT clássico de 1000 ps, permitindo a estabilização da temperatura e o ajuste do sistema sob condições fisiológicas (Harrach & Drossel, 2014).

Após o equilíbrio clássico, a simulação foi configurada para a abordagem QM/MM, na qual a região quântica (QM) foi definida para abranger o ligante e os resíduos mais próximos do sítio de ligação, utilizando um arquivo index.ndx para especificar o grupo de átomos denominado QMatoms.

Na região quântica, foi empregado o funcional PBE com o conjunto de base DZVP-MOLOPT, que oferece uma descrição precisa da densidade eletrônica e das interações quânticas. A região molecular clássica (MM) foi descrita pelo campo de força AMBER99SB-ILDN, garantindo a representação confiável das interações intramoleculares e intermoleculares. Esses parâmetros foram cuidadosamente escolhidos para assegurar que a interface CP2K no GROMACS tratasse o sistema de forma consistente em níveis quântico e clássico (Bolnykh et al, 2019).

A abordagem QM/MM foi aplicada para investigar a distribuição da densidade eletrônica na interface de interação entre o ligante e os resíduos do sítio de ligação da proteína Mpro. Essa análise permitiu observar detalhes críticos do processo de ligação, incluindo redistribuição eletrônica, formação de novas interações e o impacto dessas forças na afinidade do complexo proteína-ligante. O emprego dessa metodologia híbrida não apenas aprimorou a compreensão das interações moleculares subjacentes, mas também forneceu informações fundamentais para elucidar os mecanismos que governam a estabilidade do complexo (Laino et al, 2005) (Studer et al, 2020).

Métodos de química quântica foram empregados para realizar a otimização geométrica e os cálculos de energia de interação, utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), amplamente reconhecida por seu equilíbrio entre precisão e eficiência computacional na investigação da estrutura eletrônica de sistemas moleculares. Todas as análises foram conduzidas no software ORCA 5.0, uma ferramenta robusta e versátil para cálculos de química quântica (Grimme eta al, 2010) (Nesse, 2012) (Neese, 2017) (Vicatos et al, 2009).

Para os cálculos, foram selecionados resíduos que frequentemente formaram ligações de hidrogênio com os ligantes brussonol, komaroviquinona e mefloquina nos sítios de ligação A, B e C, conforme identificado nas simulações de dinâmica molecular. A otimização geométrica foi realizada utilizando o funcional B3LYP, com correção de dispersão D3BJ e o conjunto de base 6-31G(d), reconhecido por sua confiabilidade na descrição de geometrias e interações intermoleculares. O modelo de meio contínuo polarizável (CPCM) foi aplicado para simular um ambiente aquoso, garantindo a representação precisa das condições fisiológicas.

Após a otimização, cálculos de ponto único foram realizados para determinar a energia total dos sistemas, incluindo o complexo ligante-resíduo, o ligante isolado e os resíduos isolados. Esses cálculos forneceram insights detalhados sobre a força das interações ligante-resíduo, contribuindo para a compreensão da afinidade de ligação dos compostos estudados. A análise energética das interações permitiu identificar os fatores determinantes para a estabilização dos complexos proteína-ligante.

A energia de interação ($E_{INTERACTION}$) foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$E_{INTERAÇÃO} = E_{TOTAL} - (E_{LIGANTE} + E_{RESÍDUOS})$$

Onde:

- E_{TOTAL} é a energia total do complexo ligante-resíduo,
- $E_{LIGANTE}$ é a energia do ligante isolado,
- $E_{RESÍDUOS}$ é a energia dos resíduos isolados.

Esta fórmula permite quantificar a força das interações entre os ligantes e os resíduos. As energias, inicialmente obtidas em Hartrees, foram convertidas em kcal/mol usando o fator de conversão: 1 Hartree = 627,509 kcal/mol

Essa conversão permite uma interpretação mais fácil das energias de interação em um contexto bioquímico, onde kcal/mol é a unidade padrão de energia. O cálculo da energia de interação em kcal/mol fornece informações diretas sobre a força e a estabilidade das interações de ligação ligante-resíduo, que são essenciais para entender a eficácia potencial do brussonol, komaroviquinona e mefloquina como inibidores da proteína spike.

Além disso, os softwares Avogadro 1.2.0 e Jmol 16.3.9 foram utilizados para gerar mapas de potencial eletrostático das estruturas otimizadas. Esses mapas proporcionaram uma visualização clara das dinâmicas de interação, destacando regiões de densidade eletrônica e possíveis pontos de interação favoráveis entre os ligantes e os resíduos (Hanwell et al, 2012).

Essa abordagem combinou modelagem molecular e análises quânticas para explorar interações intermoleculares, destacando a importância dos cálculos DFT no estudo de sistemas biomoleculares complexos e no potencial terapêutico dos compostos.

3.5. Estudo dos Produtos Naturais e Compostos de Referência: Estudos ADMET, Fingerprint Molecular (MACCS-166 e ECFP-6) e Análise de Reatividade (Função de Fukui)

A análise ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) desempenha um papel crucial no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, auxiliando na previsão das propriedades farmacocinéticas e de segurança de moléculas candidatas antes de testes experimentais. A indústria farmacêutica considera diversos critérios ADMET na seleção de novos fármacos, como a absorção intestinal e a permeabilidade na barreira hematoencefálica, que influenciam a biodisponibilidade; a distribuição no organismo, incluindo a ligação a proteínas plasmáticas e a penetração tecidual; o metabolismo, especialmente as interações com enzimas do citocromo P450, que afetam a biotransformação da substância; a excreção, que determina a meia-vida e a eliminação da molécula; e a toxicidade, avaliada por parâmetros como hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e possíveis efeitos mutagênicos. Neste estudo, o servidor pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcs/>) foi utilizado para avaliar os compostos nirmatrelvir, barbatusol, brussonol e komaroviquinona. Essa ferramenta online emprega uma abordagem baseada em grafos para prever as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas de compostos químicos (Pires et al, 2015).

Grafos são estruturas matemáticas que representam conjuntos de objetos (nodos) e suas relações (arestas), amplamente aplicados na modelagem de sistemas complexos, como interações moleculares. Por meio dessa abordagem, o pkCSM permite uma análise eficiente do perfil ADMET de compostos químicos, identificando potenciais problemas relacionados à eficácia, biodisponibilidade e toxicidade. A utilização dessa plataforma oferece uma maneira rápida e acessível de prever os comportamentos farmacocinéticos e toxicológicos das moléculas, permitindo priorizar os candidatos mais promissores.

No presente estudo, a análise ADMET forneceu informações essenciais para a seleção e priorização dos compostos investigados, contribuindo para a identificação de possíveis limitações que poderiam comprometer o desenvolvimento de novos fármacos. A avaliação desses perfis reduz o custo e o tempo necessários para os estudos subsequentes, minimizando falhas em etapas experimentais e otimizando o processo de desenvolvimento de medicamentos. Essa abordagem destacou-se como uma ferramenta indispensável para a integração entre previsões computacionais e estratégias experimentais no desenvolvimento racional de novos agentes terapêuticos.

As análises de impressão digital foram realizadas utilizando duas técnicas proeminentes: MACCS-166 (Molecular ACCess System) e ECFP-6 (Extended-Connectivity Fingerprints). As chaves MACCS, que abrangem 166 fragmentos estruturais predefinidos, fornecem um vetor binário que indica a presença ou ausência desses fragmentos em uma molécula. Já as Extended-Connectivity Fingerprints (ECFP-6) geram um vetor numérico que representa a estrutura molecular com base na conectividade dos átomos. O ECFP-6 foi especialmente empregado devido à sua notável eficácia na comparação de similaridade e diversidade molecular entre diferentes classes de compostos bioativos. A similaridade entre os compostos naturais barbatusol, brussonol e komaroviquinona e os antivirais aprovados pela FDA (nirmatrelvir, ritonavir e remdesivir) foram calculadas conforme o seguinte script: (Rogers et al, 2010).

```
“from rdkit import Chem
from rdkit import DataStructs
from rdkit.Chem import MACCSkeys, AllChem
# SMILES dos compostos
smiles = {
    'Barbatusol': 'CC(C)C1=C(C(=C2CC3=CCCC(C3CCC2=C1)(C)C)O)O',
    'Brussonol': 'CC(C)C1=C(C(=C2CC34CCCC(C3CC(C2=C1)O4)(C)C)O)O',
```

```

'Komaroviquinone':
'CC(C)C1=C(C(=O)C2=C(C1=O)C3(CC4C(CCCC4(C2)O3)(C)C)O)OC',
'Nirmatrelvir':
'CC1(C2C1C(N(C2)C(=O)C(C(C)(C)C)NC(=O)C(F)(F)F)C(=O)NC(CC3CCNC3=O)C#N)C'
}

# Criar moléculas RDKit e calcular Fingerprints
molecules = {name: Chem.MolFromSmiles(smiles_string) for name, smiles_string in
smiles.items()}

maccs_fps = {name: MACCSkeys.GenMACCSKeys(mol) for name, mol in molecules.items()}
ecfp6_fps = {name: AllChem.GetMorganFingerprint(mol, 3) for name, mol in
molecules.items()}

# Função para calcular e exibir a similaridade
def calculate_similarity(fps, method, similarity_function):
    print(f"\nSimilarity using {method}")
    for name1, fp1 in fps.items():
        for name2, fp2 in fps.items():
            if name1 != name2:
                sim = similarity_function(fp1, fp2)
                print(f"Similarity between {name1} and {name2}: {sim:.2f}")

# Calcular e exibir a similaridade
calculate_similarity(maccs_fps, 'MACCS-166', DataStructs.FingerprintSimilarity)
calculate_similarity(ecfp6_fps, 'ECFP-6', DataStructs.DiceSimilarity)"
```

As notações SMILES dos compostos investigados e dos inibidores de referência aprovados pela FDA foram obtidas no banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para gerar suas respectivas impressões digitais moleculares, foi utilizada a biblioteca RDKit (<https://rdkit.org/>) (Assaf et al, 2024) (Bento et al, 2020). Impressões digitais moleculares foram computadas para cada molécula usando as abordagens MACCS-166 e ECFP-6, facilitando as avaliações subsequentes de similaridade. A similaridade entre cada par de moléculas foi quantificada por métricas apropriadas, como o coeficiente de Tanimoto para MACCS-166 e a métrica de similaridade baseada em dados para ECFP-6. As pontuações de similaridade resultantes forneceram insights valiosos sobre a relação estrutural entre os compostos investigados e os antivirais aprovados pela FDA, elucidando seus potenciais fundamentos mecanísticos e auxiliando nos esforços de pesquisa *in silico*.

A análise de Fukui, fundamentada na Teoria do Funcional da Densidade (DFT), foi conduzida de forma rigorosa neste estudo. Inicialmente, as densidades eletrônicas dos sistemas nos estados de carga neutro, positivo e negativo foram calculadas utilizando o software Orca, em combinação com o funcional B3LYP e o conjunto de base 6-311G*. Com base nesses cálculos preliminares, os índices de Fukui foram determinados, permitindo uma análise detalhada das regiões reativas dos compostos (Alcoba et al, 2013).

As populações atômicas, conhecidas como populações de Mulliken, foram extraídas diretamente dos arquivos de saída do Orca (.out) para os estados de carga mencionados (neutro, cátion e ânion). A partir desses valores, as funções de Fukui foram calculadas por meio das seguintes expressões:

- $f_i^+ = q_i(N + 1) - q_i(N)$: Função de Fukui para ataque nucleofílico.
- $f_i^- = q_i(N) - q_i(N - 1)$: Função de Fukui para ataque eletrofílico.
- $f_i^0 = \frac{1}{2} [q_i(N + 1) - q_i(N - 1)]$: Função de Fukui para reatividade radicalar.

Esses cálculos foram realizados com o objetivo principal de identificar os centros eletrofílicos e nucleofílicos de cada ligante analisado, incluindo barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir. A identificação dessas regiões reativas forneceu informações valiosas sobre as propriedades de ligação e reatividade dos ligantes, contribuindo para a compreensão de seus potenciais mecanismos de interação com alvos moleculares.

A metodologia seguida baseou-se na documentação oficial do software Orca e nas orientações detalhadas disponíveis em seu site oficial (https://www.orcasoftware.de/tutorials_orca/react/FUKUI.html), garantindo a aplicação precisa e confiável da análise de Fukui.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo de Caso I: Inibição da Proteína Mpro

4.1.1. Caracterização do Sítio de Ligação

Neste estudo, realizamos uma análise abrangente do sítio de ligação da proteína Mpro (protease principal do SARS-CoV-2) utilizando informações reportadas na literatura e predições obtidas com o servidor de predição GRaSP. A proteína Mpro é conhecida por sua divisão estrutural em três domínios principais, sendo o sítio de ligação localizado em uma fenda entre os Domínios I e II. Dentro desse sítio, destaca-se o resíduo Cys145, que, em conjunto com His41, forma a diáde catalítica essencial para a atividade proteolítica da enzima. Esse resíduo desempenha um papel fundamental no mecanismo de clivagem dos substratos virais, sendo um alvo estratégico para o desenvolvimento de inibidores antivirais. Muitos compostos exploram a reatividade nucleofílica da Cys145 para estabelecer interações covalentes irreversíveis, bloqueando a função da Mpro e impedindo a replicação viral (Poli et al, 2024).

De acordo com a literatura, os resíduos que compõem o sítio de ligação incluem: Thr24, Thr25, His41, Met49, Tyr54, Phe140, Leu141, Asn142, Cys145, His163, Met165, Glu166, Leu167, Pro168, His172, Phe185, Asp187, Gln189 e Gln192. Esses resíduos formam uma rede de interações críticas para a ligação de ligantes e a estabilização do complexo proteína-ligante.

Com o objetivo de validar e complementar essas informações, empregamos o servidor GRaSP, que utiliza algoritmos de aprendizado de máquina para a predição de sítios de ligação em proteínas. Os resultados da análise indicaram resíduos com alta confiança de predição, como: His41 (85%), Phe140 (89%), Asn142 (81%), Cys145 (94%), His163 (88%), His164 (92%) e His172 (87%).

Esses resíduos correspondem a regiões críticas do sítio de ligação, amplamente descritas na literatura, corroborando sua importância funcional. Além disso, o GRaSP identificou resíduos adicionais com níveis moderados de confiança de predição, incluindo: Asn28 (62%), Leu141 (71%), Gly143 (78%), Ser144 (65%), Met165 (64%), Asp187 (73%), Gly146 (51%), Met162 (54%), Glu166 (51%) e Pro168 (56%).

Esses resíduos adicionais podem desempenhar papéis complementares na estabilização do ligante ou na dinâmica do sítio de ligação, embora suas contribuições sejam menos evidentes em predições de alta confiança. A presença de resíduos como Cys145,

amplamente reconhecido como parte do sítio catalítico, e de resíduos polares como His163 e Glu166, reforça a relevância desses locais para a ligação e para o potencial desenvolvimento de inibidores seletivos.

4.1.2. Resultados de Docking Molecular

O acoplamento molecular foi realizado no sítio de ligação da Mpro, utilizando uma grade que abrangeu todos os resíduos previamente identificados. Este procedimento teve como objetivo investigar potenciais interações entre a proteína e diferentes compostos, incluindo os produtos naturais barbatusol, brussonol e komaroviquinona, além do fármaco de referência nirmatrelvir. As simulações de docking foram realizadas com as estruturas monomérica (PDB ID: 6LU7) e dimerizada (PDB ID: 6M2Q) da Mpro, em diversos intervalos de tempo (0 ns, 50 ns, 100 ns, 150 ns, 200 ns, 250 ns e 300 ns), e os resultados de energia de ligação foram compilados na Tabela 1.

Os valores médios de energia de ligação para a estrutura monomérica indicam uma afinidade moderada dos compostos investigados pelo sítio ativo. As energias médias variaram de -6,7 kcal/mol (komaroviquinona) a -6,9 kcal/mol (nirmatrelvir e brussonol). O desvio padrão relativamente baixo (0,3 a 0,4) reflete a consistência dos resultados ao longo dos diferentes tempos de simulação. Apesar de as energias de ligação observadas no monômero serem inferiores às registradas no dímero, especialmente no Sítio A, elas ainda sugerem uma interação estável dos ligantes com a proteína.

Para o dímero, os valores de energia de ligação foram avaliados separadamente para os Sítios A e B, que correspondem às regiões de interação nos dois monômeros que compõem o dímero.

Os resultados mostram que os compostos naturais, em especial barbatusol e brussonol, apresentaram as melhores energias de ligação no Sítio A. As médias de energia foram de -8,3 kcal/mol para barbatusol e -8,5 kcal/mol para brussonol, indicando uma afinidade superior à de outros compostos. A komaroviquinona e o nirmatrelvir exibiram valores médios de energia de ligação de -7,6 kcal/mol e -7,4 kcal/mol, respectivamente, com desvios padrão baixos (0,7 a 0,8), o que reflete uma interação estável ao longo das simulações.

No Sítio B, as energias de ligação foram, em geral, mais baixas do que as registradas no Sítio A. O brussonol manteve um desempenho consistente, com uma média de -6,8 kcal/mol, seguido por komaroviquinona (-6,9 kcal/mol) e nirmatrelvir (-7,2 kcal/mol). Esses valores

sugerem que os compostos investigados possuem afinidade pelo Sítio B, embora em menor magnitude em relação ao Sítio A.

A análise comparativa dos resultados revela que o Sítio A do dímero é mais favorável para a ligação dos compostos investigados, com energias de ligação mais negativas e menores desvios padrão. Os produtos naturais barbatusol e brussonol demonstraram uma afinidade particularmente elevada por este sítio, superando os valores obtidos para o fármaco de referência nirmatrelvir. Essa diferença sugere que esses compostos naturais possuem características estruturais que favorecem interações mais fortes e estáveis no Sítio A.

Já a komaroviquinona apresentou valores de energia de ligação próximos aos do nirmatrelvir em ambos os sítios, indicando um perfil de interação estável e promissor. A similaridade nas energias de ligação da komaroviquinona em relação ao nirmatrelvir, que é um medicamento aprovado para o tratamento da COVID-19, reforça seu potencial como um candidato terapêutico. Estudos adicionais, incluindo análises *in vitro* e *in vivo*, serão fundamentais para confirmar sua eficácia e segurança, validando sua capacidade de inibir a replicação viral e viabilizando seu desenvolvimento como um fármaco antiviral.

Os resultados do docking molecular demonstram que os compostos naturais estudados têm potencial terapêutico significativo, especialmente no caso do barbatusol e do brussonol, que se destacaram pelas maiores afinidades no Sítio A do dímero. A capacidade da komaroviquinona de apresentar valores de energia de ligação similares aos do nirmatrelvir também é notável, apontando para sua versatilidade em interagir com diferentes sítios de ligação.

Essas análises não apenas destacam o potencial dos compostos naturais como candidatos a inibidores da Mpro, mas também reforçam a importância de estudos contínuos para validar e otimizar suas propriedades bioquímicas e farmacológicas. A investigação de múltiplos tempos de simulação e diferentes conformações estruturais fornece uma base sólida para futuras etapas de desenvolvimento e avaliação experimental.

Tabela 1 - Energias de ligação (kcal/mol) obtidas nas simulações de docking molecular para as estruturas monomérica (PDB ID 6LU7) e dimérica (PDB ID 6M2Q) da Mpro com os ligantes barbatusol, brussonol, komarovquinona e nirmatrelvir, avaliadas em diferentes intervalos de tempo das simulações de dinâmica molecular (0 ns a 300 ns).

TIME	BARBATUSOL	BRUSSONOL	KOMAROVIQUINONA	NIRMATRELVIR
MONÔMERO 6LU7				
Energy (kcal/mol)				
0 ns	-7,2	-7,2	-6,8	-7,3
50 ns	-6,7	-6,6	-6,7	-7,3
100 ns	-6,2	-6,7	-6,9	-7,0
150 ns	-6,7	-6,9	-6,6	-6,8
200 ns	-7,4	-7,1	-6,2	-6,8
250 ns	-6,5	-6,5	-6,5	-6,2
300 ns	-6,6	-7,4	-7,1	-6,9
Média	-6,8	-6,9	-6,7	-6,9
Desvio Padrão	0,4	0,3	0,3	0,4
DÍMERO 6M2Q SITIO DE LIGAÇÃO A				
Energy (kcal/mol)				
0 ns	-9,1	-9,4	-8,3	-7,4
50 ns	-8,6	-8,8	-6,8	-7,5
100 ns	-8,8	-9,1	-8,4	-7
150 ns	-8,6	-9	-7,3	-7,5
200 ns	-6,8	-7,7	-7	-6,9
250 ns	-8,5	-8,6	-8,1	-7,8
300 ns	-7,5	-7,1	-7	-7,4
Média	-8,3	-8,5	-7,6	-7,4
Desvio Padrão	0,8	0,8	0,7	0,3
DÍMERO 6M2Q SITIO DE LIGAÇÃO B				
Energy (kcal/mol)				
0 ns	-6,9	-7	-7,1	-7,2
50 ns	-6,8	-6,9	-7,1	-7,7
100 ns	-6,7	-6,9	-7,4	-7,3
150 ns	-6,8	-6,7	-6,6	-7,1
200 ns	-7	-6,7	-6,8	-7,1
250 ns	-6,6	-6,9	-6,9	-7,7
300 ns	-6,5	-6,4	-6,7	-6,4
Média	-6,8	-6,8	-6,9	-7,2
Desvio Padrão	0,2	0,2	0,3	0,4

Fonte: elaborada pelo autor.

4.1.3. Resultados de Dinâmica Molecular

O RMSD é amplamente utilizado em simulações de Dinâmica Molecular (DM) como um indicador de estabilidade estrutural, refletindo a variação média das posições atômicas em relação a uma estrutura padrão. Valores menores de RMSD indicam maior estabilidade da proteína em análise. No estudo da proteína Mpro do SARS-CoV-2, os resultados revelaram diferenças importantes. Para o monômero (PDB ID 6LU7), o RMSD médio foi de 0,44 Å, enquanto para o dímero (PDB ID 6M2Q), o valor médio foi ligeiramente superior, 0,48 Å. Essa diferença pode ser atribuída à maior complexidade estrutural do dímero, que resulta em flutuações adicionais devido a interações intermoleculares (ver gráfico 1).

No monômero, os RMSDs médios permaneceram estáveis em 0,43 Å, independentemente do ligante. Isso indica que os ligantes barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir não causaram perturbações significativas na estrutura geral da proteína, corroborando a estabilidade das simulações. No contexto do dímero, os ligantes komaroviquinona e barbatusol demonstraram maior estabilidade, com RMSDs médios de 0,42 Å, em comparação com o nirmatrelvir (0,44 Å) e o brussonol (0,43 Å). Essas variações, embora sutis, sugerem uma adaptação ligeiramente superior do dímero na presença de komaroviquinona e barbatusol.

A análise de RMSF (Flutuação Quadrática Média) destacou resíduos específicos que apresentaram maior ou menor mobilidade em função do ligante. A diferença de RMSF entre a proteína em água e a proteína ligada a cada ligante permitiu inferir os efeitos estabilizadores dos compostos. Valores positivos indicam uma redução na mobilidade, sugerindo estabilização dos resíduos pela interação com o ligante.

Ao analisar as simulações dos ligantes com o monômero (PDB ID 6LU7) observou-se que nirmatrelvir estabilizou principalmente os resíduos Ser123 (0,37 Å) e Gly124 (0,38 Å), com reduções de mobilidade de 0,19 Å e 0,10 Å, respectivamente. Os resíduos Ala116 (0,36 Å), Tyr126 (0,41 Å) e Gly138 (0,46 Å) também tiveram reduções de mobilidade de aproximadamente 0,03 Å. Já barbatusol promoveu a estabilização de Leu141 (0,54 Å) e Ser123 (0,47 Å), com reduções de mobilidade de 0,10 Å. Enquanto isso, brussonol estabilizou os resíduos Leu141 (0,56 Å), Tyr118 (0,59 Å) e Phe140 (0,38 Å), com reduções de mobilidade de 0,08 Å, 0,02 Å e 0,02 Å, respectivamente. Por fim, a komaroviquinona afetou Ser123 (0,41 Å), Ser144 (0,35 Å) e Leu141 (0,52 Å), com reduções de 0,16 Å, 0,13 Å e 0,12 Å, respectivamente. Os resíduos Gly124 (0,39 Å), Tyr118 (0,56 Å), Phe140 (0,37 Å), Ala116 (0,36 Å) e Gly138 (0,47 Å) tiveram reduções de 0,09 Å, 0,05 Å, 0,04 Å, 0,03 Å e 0,02 Å. As maiores reduções

podem estar relacionadas às ligações de hidrogênio formadas entre esses resíduos e os ligantes, enquanto as menores reduções podem estar ligadas a interações mais fracas.

No estudo das interações dos ligantes com os resíduos do dímero (PDB ID 6M2Q), observou-se uma significativa diminuição do RMSF nos sítios de ligação A e B, evidenciando uma estabilização desses resíduos pela ligação dos compostos. Os valores citados a seguir são derivados da diminuição do valor de RMSF da simulação da proteína em água em comparação com o valor da simulação da proteína e ligante em água, realçando a influência positiva desses compostos na estabilização dos resíduos da Mpro e são listados para os ligantes na seguinte ordem: barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir. No sítio A, o resíduo ASN142 apresentou uma diminuição de RMSF de 0,29 Å, 0,42 Å, 0,27 Å e 0,47 Å, e para CYS145 foi de 0,46 Å, 0,40 Å, 0,35 Å e 0,44 Å. No sítio B, a redução no RMSF para o resíduo ASN142 foi de 0,22 Å, 0,13 Å, 0,16 Å e 0,12 Å, e para CYS145 foi de 0,20 Å, 0,16 Å, 0,32 Å e 0,33 Å. O resíduo MET165 também apresentou diminuições notáveis no sítio B, com valores de 0,19 Å, 0,14 Å, 0,18 Å e 0,20 Å.

A análise dos valores de RMSF para o resíduo CYS145 no dímero da proteína Mpro revela informações significativas. Enquanto no monômero não foi possível verificar tais valores, a avaliação no dímero evidenciou flutuações notáveis. O nirmatrelvir, já em uso no combate à COVID-19, apresentou uma diminuição do RMSF de 0,44 Å e 0,33 Å nos sítios A e B, respectivamente. Já os produtos naturais estudados, barbatusol, brussonol e komaroviquinona, também apresentaram diminuições consideráveis, destacando-se por seus potenciais em interagir eficientemente com o resíduo CYS145 da proteína Mpro. A komaroviquinona mostrou um comportamento similar em ambos os sítios de ligação da proteína Mpro, apresentando uma diminuição do RMSF de 0,35 Å no sítio A e 0,32 Å no sítio B para o resíduo CYS145. Esse efeito equilibrado em ambos os sítios evidencia a capacidade da komaroviquinona de interagir de maneira estável com esse resíduo específico da proteína em diferentes regiões. A consistência dessa interação reforça seu potencial como um agente terapêutico eficaz, proporcionando uma base sólida para pesquisas adicionais sobre seu papel e mecanismo de ação na inibição da proteína Mpro, uma etapa crucial para o desenvolvimento de terapias contra a COVID-19.

A função "gmx mindist" foi empregada para analisar a distância mínima média entre a proteína e os ligantes nos sistemas. Os resultados obtidos indicam que todos os ligantes interagem diferentemente com a proteína, exibindo distâncias médias e flutuações variáveis.

Na análise da distância mínima média entre a proteína e os ligantes no monômero 6LU7, o nirmatrelvir destacou-se por apresentar a menor distância média de 1,80 Å, com um

desvio padrão de 0,11 Å, indicando uma interação mais íntima com a proteína. No entanto, no dímero apresentou distâncias médias de 1,90 Å e 1,89 Å nos sítios A e B, respectivamente, com desvios padrão de 0,13 Å e 0,11 Å. Em contraste, o brussonol exibiu a maior distância média no monômero, sendo 2,03 Å, com um desvio padrão de 0,09 Å; no dímero, as distâncias médias foram de 1,98 Å e 1,93 Å nos sítios A e B, com desvios padrão de 0,14 Å e 0,13 Å, respectivamente. A komaroviquinona e o barbatusol registraram nos monômeros distâncias médias de 1,94 Å e 1,84 Å, e desvios padrão de 0,10 Å e 0,12 Å, respectivamente. No dímero, komaroviquinona apresentou distâncias médias de 1,86 Å e 2,03 Å nos sítios A e B, com desvios padrão de 0,11 Å e 0,12 Å, e barbatusol apresentou distâncias médias de 1,97 Å e 2,02 Å nos sítios A e B, com desvios padrão de 0,13 Å em ambos os casos. Estes resultados indicam que todos os ligantes interagem de forma diferente com a proteína, apresentando distâncias médias e flutuações variáveis. Variações nos desvios-padrão também sugerem diferenças na estabilidade dessas interações ao longo das simulações.

A análise detalhada do RMSD, RMSF e distâncias mínimas reforça o potencial dos compostos naturais estudados, especialmente o barbatusol e a komaroviquinona, que demonstraram interações estáveis e favoráveis com os sítios do dímero da Mpro. Esses resultados fornecem uma base sólida para investigações experimentais e o desenvolvimento de inibidores mais eficazes para o tratamento da COVID-19.

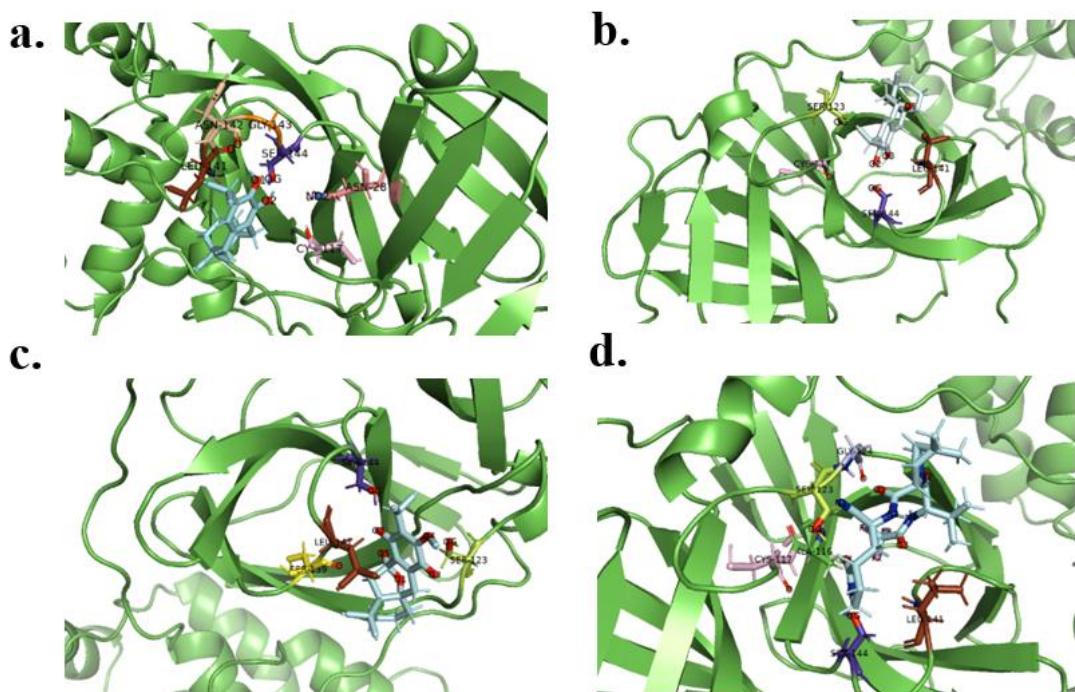
O Rg (raio de giro) foi utilizado como uma métrica fundamental para avaliar a compacidade da proteína Mpro do SARS-CoV-2 em complexo com os ligantes analisados. Esse parâmetro fornece insights valiosos sobre a estabilidade e a conformação estrutural da proteína, sendo essencial para compreender sua dinâmica global. Os valores médios de Rg observados para cada sistema simulado indicaram alta compacidade e baixa variação, sugerindo que a conformação da proteína não foi significativamente alterada pela presença dos ligantes. Isso reflete uma estabilização global da estrutura da Mpro em todas as simulações realizadas.

Para a estrutura do monômero (PDB ID 6LU7), o Rg médio foi de aproximadamente 21,9 Å, com um desvio padrão de cerca de 0,03 Å. Já para o dímero (PDB ID 6M2Q), o valor médio foi mais elevado, 25,4 Å, com um desvio padrão de 0,02 Å. Essa diferença é atribuída à maior complexidade e ao tamanho do dímero, que naturalmente apresenta um Rg mais elevado. Apesar disso, ambos os sistemas demonstraram alta compacidade, indicando que a presença dos ligantes não comprometeu a integridade estrutural da proteína. Essa estabilidade pode ser explicada pelas robustas interações intramoleculares de ligação de hidrogênio, contabilizando cerca de 240 interações no monômero e 480 no dímero, incluindo 24 interações específicas entre as cadeias A e B.

Adicionalmente, os produtos escalares dos autovetores dos movimentos atômicos foram analisados para avaliar a dinâmica das proteínas em presença dos diferentes ligantes. Os valores médios desses produtos escalares, que medem a similaridade entre os movimentos atômicos, foram próximos de 1 para todos os sistemas, tanto no monômero quanto no dímero. Esses resultados indicam que os padrões de movimento da proteína são amplamente semelhantes entre os sistemas, sugerindo que os quatro ligantes compartilham características similares em suas interações com a proteína. Isso reforça o potencial de todos os ligantes em inibir a atividade da Mpro, dado o comportamento dinâmico consistente observado.

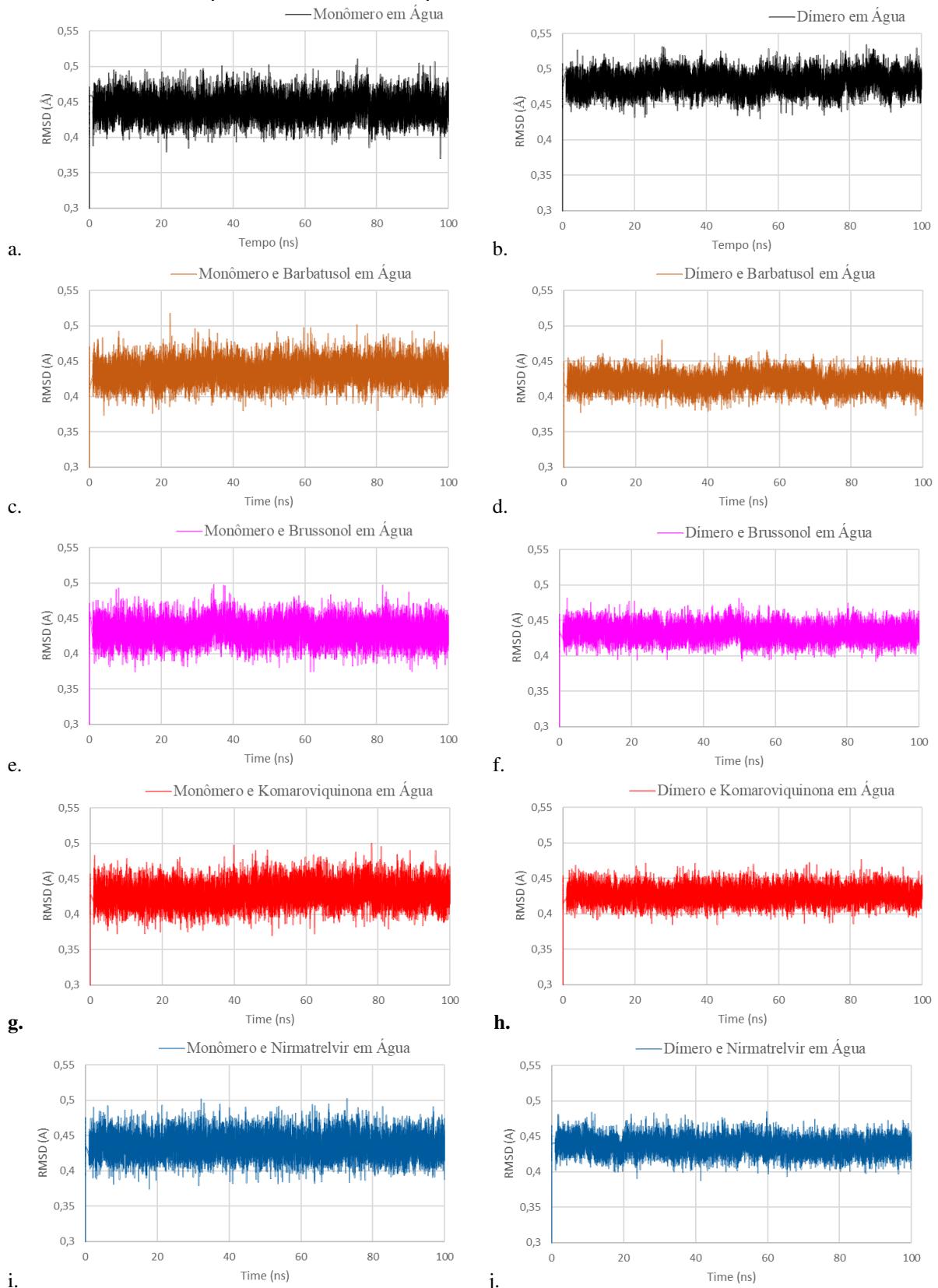
A figura 6 apresenta as estruturas médias dos monômeros resultantes das simulações de dinâmica molecular da proteína Mpro em complexo com os diferentes ligantes, destacando os principais resíduos de interação. Essas representações foram geradas após uma análise de covariância, conduzida utilizando o software GROMACS (função gmx covar), proporcionando uma visualização detalhada das principais características estruturais e dinâmicas dos sistemas estudados.

Figura 6 - Estruturas médias da proteína Mpro SARS-CoV-2 em complexo com diferentes ligantes de simulações de dinâmica molecular, destacando resíduos chave da interação. (a) Proteína e barbatusol em água, (b) Proteína e brussonol em água, (c) Proteína e komaroviquinona em água, e (d) Proteína e nirmatrelvir em água. As figuras mostram o ligante no sítio de ligação e os resíduos interagindo no local. As estruturas foram derivadas da análise de covariância utilizando o software GROMACS (gmx covar), que calcula a matriz de covariância das flutuações atômicas ao longo da simulação, permitindo a extração de modos principais de movimento da proteína.



Fonte: elaborada pelo autor.

Gráfico 1 - Análise do RMSD. (a) e (b) Monômero e Dímero em água sem ligante, respectivamente. (c) (e) (g) (i) sistemas com monômero e os ligantes barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, respectivamente. (d) (f) (h) (j) sistema com dímero e os ligante barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, respectivamente.



Fonte: elaborada pelo autor.

Neste estudo, as interações por ligações de hidrogênio entre a proteína Mpro e os ligantes foram analisadas utilizando o software GROMACS 2022.5 com o comando gmx hbond. Foram considerados ângulos doador-aceptor de hidrogênio menores ou iguais a 30 graus e distâncias doador-aceptor de até 0,35 nm. Essa análise é essencial para compreender a estabilidade e a afinidade dos complexos proteína-ligante, fornecendo uma base sólida para investigar o potencial terapêutico dos compostos.

Nas simulações realizadas com o monômero (PDB ID 6LU7), o nirmatrelvir estabeleceu oito diferentes tipos de ligações de hidrogênio com os resíduos presentes no sítio de ligação. Destacam-se interações específicas com os resíduos SER123 (OG) e SER144 (OG), que atuaram como doadores para os átomos de nitrogênio (N1 e N5) e oxigênio (O4) do ligante. O resíduo GLY124 (N, O) demonstrou uma dupla função, atuando tanto como doador (O1) quanto como aceitador (N4) para o ligante. Já o resíduo LEU141 (N) atuou como doador para o átomo de oxigênio do ligante (O3), enquanto o resíduo CYS117 (O) desempenhou o papel de aceitador para o átomo de nitrogênio do ligante (N5). Por outro lado, a komaroviquinona apresentou quatro diferentes tipos de ligações de hidrogênio. Os resíduos SER123 (OG), LEU141 (N) e SER144 (OG) atuaram como doadores para os átomos de oxigênio do ligante (O2 e O3). Já o resíduo SER139 (O) desempenhou o papel de aceitador, interagindo com o átomo de oxigênio (O5) do ligante. Já o barbatusol formou 10 diferentes tipos de ligações de hidrogênio. Os resíduos ASN28 (ND2) e SER144 (OG) atuaram como doadores, enquanto os resíduos CYS117, ASN142 (O) e GLY143 (O) desempenharam o papel de aceitadores para os átomos de oxigênio do ligante (O1 e O2). O resíduo LEU141 (N e O) destacou-se por atuar tanto como doador quanto como aceitador. Por último, brussonol apresentou cinco diferentes ligações de hidrogênio. O resíduo SER144 (OG) demonstrou uma função dupla, atuando como doador e aceitador para os átomos de oxigênio do ligante. Os resíduos SER123 (OG) e LEU141 (N) atuaram exclusivamente como doadores, enquanto o resíduo CYS117 (O) foi identificado como aceitador.

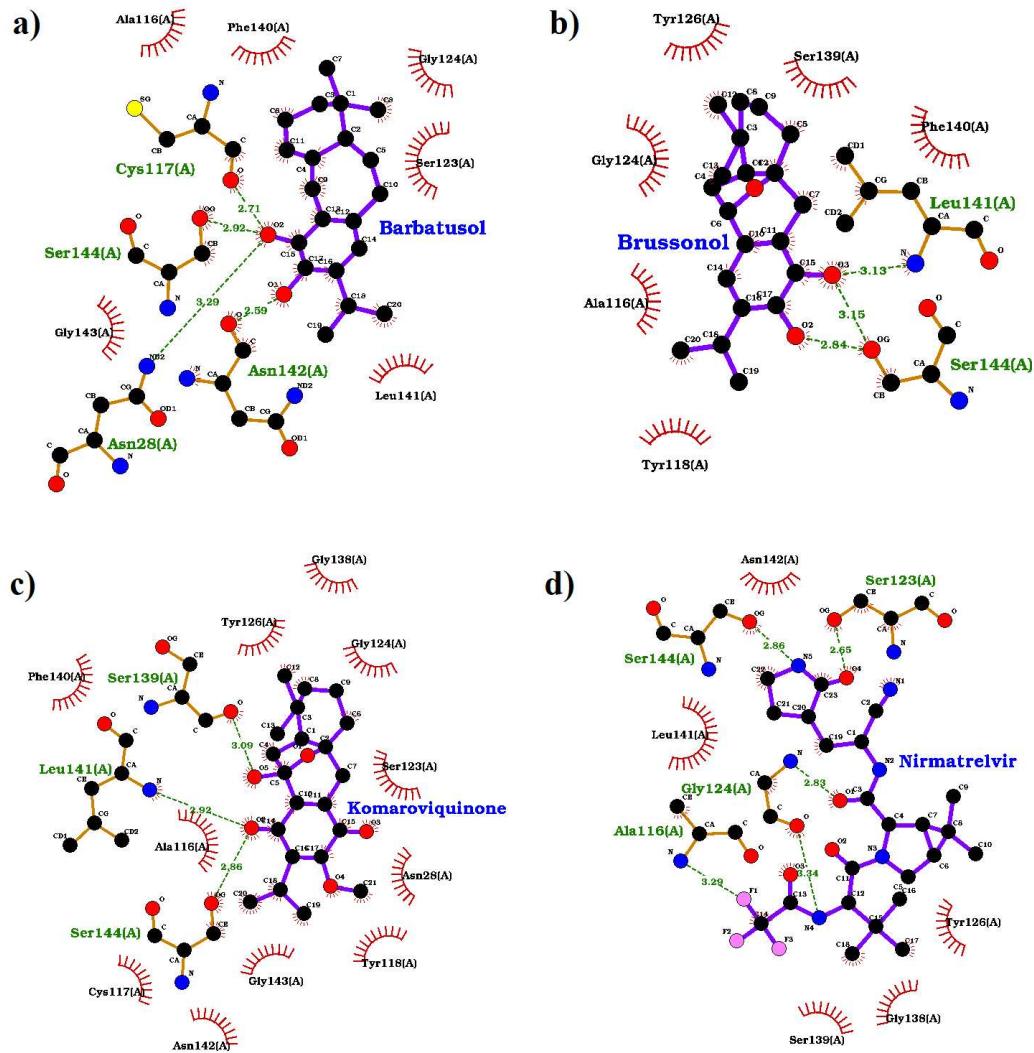
Nas simulações com o dímero (PDB ID 6M2Q), as análises foram realizadas separadamente para os sítios de ligação A e B, revelando diferenças importantes no comportamento dos ligantes. A komaroviquinona destacou-se no sítio A, formando em média 2,6 ligações de hidrogênio por quadro por período de tempo, superando o nirmatrelvir, que apresentou 2,2 ligações por quadro por período de tempo. Já no sítio B, o brussonol demonstrou a melhor média entre os produtos naturais, com 1,7 ligações por quadro por período de tempo, inferior ao desempenho do nirmatrelvir, que alcançou 2,4 ligações por quadro por período de tempo.

A análise detalhada das interações no dímero evidenciou o papel dual de alguns compostos, como o barbatusol, que atuou tanto como doador quanto como aceitador em diversas interações. Por exemplo, seus átomos de oxigênio (O1 e O2) foram responsáveis por ligações de hidrogênio com resíduos críticos como ASN142 (ND2) e GLY143 (N) no sítio A, e com THR25 (OG1) e SER46 (N) no sítio B. O brussonol, por sua vez, demonstrou interações estáveis com o resíduo GLN189 (NE2) no sítio B, destacando sua capacidade de estabilizar essa região.

A komaroviquinona exibiu um padrão de interação distinto, atuando predominantemente como aceitadora em resíduos como SER46 (OG) e ASN142 (ND2) no sítio A, e GLY143 (N) no sítio B. Essas interações, associadas à formação de múltiplas ligações de hidrogênio com resíduos, reforçam sua capacidade de estabilizar a proteína Mpro em diferentes sítios de ligação. O nirmatrelvir, por sua vez, mostrou-se eficaz, com ligações de hidrogênio consistentes nos dois sítios, incluindo interações com GLU166 (N), ASN142 (ND2) e CYS145 (N).

Esses resultados ressaltam a importância das ligações de hidrogênio como mediadoras-chave da estabilidade dos complexos proteína-ligante. Compostos como komaroviquinona, barbatusol e brussonol demonstraram um desempenho promissor, estabelecendo interações estáveis e específicas nos sítios de ligação do monômero e dímero da Mpro. Comparativamente, o desempenho do nirmatrelvir continua sendo uma referência importante, destacando a relevância de explorar os produtos naturais como potenciais inibidores da Mpro (ver figura 7).

Figura 7 - Representação de ligantes e seus principais resíduos interagindo dentro do sítio de ligação. As interações são ilustradas usando LigPlot. (a) Proteína e barbatusol em água, (b) Proteína e brussonol em água, (c) Proteína e komaroviquinona em água, e (d) Proteína e nirmatrelvir em água.



Fonte: elaborada pelo autor.

Energias coulômbicas de curto alcance (Coul-SR) e energias de Lennard-Jones (LJ-SR) foram calculadas para cada ligante interagindo com a protease principal Mpro do SARS-CoV-2. A energia Coul-SR descreve a interação eletrostática entre átomos carregados positiva e negativamente situados em estreita proximidade, enquanto a energia LJ-SR representa a interação entre átomos não carregados em condições similares. A combinação dessas energias resulta na energia total, indicando a estabilidade da interação proteína-ligante.

Na avaliação dos ligantes, o nirmatrelvir destacou-se, exibindo as energias de ligação mais negativas (-57,20 kcal/mol para o monômero e -60,69 kcal/mol e -59,47 kcal/mol para o dímero nos sítios A e B, respectivamente). Este comportamento foi seguido de perto pela komaroviquinona, que registrou -47,17 kcal/mol para o monômero, e -56,16 kcal/mol e -45,91 kcal/mol para o dímero nos sítios A e B, respectivamente. Em contraste, o barbatusol e o brussonol apresentaram energias de ligação menos negativas, conforme detalhado na tabela 2.

Tabela 2 - Energias de interação calculadas (em kcal/mol) para os compostos barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir com a proteína Mpro do SARS-CoV-2. Os valores estão detalhados para os estados monomérico (6LU7) e dímerico (6M2Q) nos sítios de ligação A e B. São apresentadas as contribuições específicas das interações de Coulomb de curto alcance (Coul-SR) e de Lennard-Jones de curto alcance (LJ-SR), bem como a energia total de interação (TOTAL) para cada composto e configuração. Os valores entre parênteses representam o erro estimado (Err.Est.), que indica a incerteza associada à média dos cálculos de energia ao longo da simulação de dinâmica molecular. Um Err.Est. menor sugere uma maior estabilidade e convergência dos valores médios de energia, enquanto valores mais altos podem indicar flutuações significativas ao longo da simulação.

Energy (kcal/mol)	BARBATUSOL	BRUSSONOL	KOMAROVIQUINONA	NIRMATRELVIR
MONOMERO 6LU7				
Coul-SR	-10,90 (0,06)	-7,69 (0,19)	-12,27 (0,05)	-22,87 (0,1)
LJ-SR	-24,73 (0,16)	-28,01 (0,26)	-34,90 (0,02)	-34,33 (0,06)
TOTAL	-35,63	-35,70	-47,17	-57,20
DIMERO 6M2Q SITIO DE LIGAÇÃO A				
Coul-SR	-11,70 (0,06)	-7,02 (0,1)	-17,28 (0,26)	-17,25 (0,29)
LJ-SR	-38,21 (0,24)	-32,56 (0,29)	-38,88 (0,1)	-43,44 (0,16)
TOTAL	-49,91	-39,58	-56,16	-60,69
DIMERO 6M2Q SITIO DE LIGAÇÃO B				
Coul-SR	-4,05 (0,05)	-9,50 (0,06)	-11,26 (0,08)	-16,36 (0,05)
LJ-SR	-31,77 (0,03)	-29,40 (0,1)	-34,65 (0,06)	-43,11 (0,12)
TOTAL	-35,82	-38,90	-45,91	-59,47

Fonte: elaborada pelo autor.

Ao analisar a contribuição energética dos termos Coul-SR e LJ-SR, verificou-se que nirmatrelvir e komaroviquinona apresentaram os valores mais negativos, indicando

interações mais robustas com a protease Mpro em comparação com barbatusol e brussonol. Esse padrão foi particularmente acentuado nas simulações envolvendo a estrutura do dímero (PDB ID 6M2Q), onde todas as moléculas exibiram energias de ligação mais negativas, especialmente no sítio de ligação A. No entanto, a decomposição das energias de interação Coul-SR e LJ-SR não pode ser validada experimentalmente e deve ser interpretada com cautela, considerando fatores como a presença de solventes e a conformação do ligante. Apesar dessas limitações, os resultados fornecem informações valiosas para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos e para a elucidação dos mecanismos de ação de produtos naturais potencialmente eficazes contra o SARS-CoV-2.

As energias de interação dos complexos monomérico e dimerizado foram minuciosamente avaliadas utilizando o software gmx_MMPBSA, conforme detalhado na tabela 3. Essa tabela apresenta as médias das diversas contribuições energéticas, incluindo energia de van der Waals (VDWAALS), energia eletrostática (EEL), energia de solvatação polar (EGB), energia de solvatação apolar (ESURF), energia total em fase gasosa (GGAS), energia total de solvatação (GSOLV) e a energia total de ligação (TOTAL) (Valdés-Tresanco et al, 2021).

No contexto do monômero (PDB ID 6LU7), a energia total média revelou -31,18 kcal/mol para nirmatrelvir, -31,21 kcal/mol para komarovquinona, -27,45 kcal/mol para brussonol e -24,64 kcal/mol para barbatusol. Tais valores negativos indicam interações favoráveis entre os ligantes e a proteína Mpro do SARS-CoV-2. Ao analisar o dímero (PDB ID 6M2Q), observa-se que o nirmatrelvir continua a demonstrar substancial energia de ligação em ambos os sítios, com -33,61 kcal/mol e -30,89 kcal/mol nos sítios de ligação A e B, respectivamente, reforçando sua eficácia conhecida contra a COVID-19. A komarovquinona apresentou energias competitivas de -37,23 kcal/mol e -26,94 kcal/mol nos sítios A e B, sublinhando seu potencial como alternativa terapêutica. Para o barbatusol e o brussonol, as energias no dímero foram de -38,39 kcal/mol e -26,66 kcal/mol no sítio A, e -26,31 kcal/mol e -28,28 kcal/mol no sítio B, respectivamente, sugerindo interações consistentemente favoráveis.

Os resultados destacam não apenas a eficácia já reconhecida do nirmatrelvir contra a COVID-19, mas também o potencial promissor da komarovquinona e do barbatusol, que exibiram energias de ligação comparáveis ao nirmatrelvir. Isso reforça o potencial desses compostos como candidatos terapêuticos eficazes para interação com a proteína-alvo. Embora o brussonol apresente energias de ligação mais modestas, seus valores ainda indicam interações benéficas com a proteína Mpro, consolidando sua relevância para estudos futuros.

Tabela 3 - Energias calculadas (em kcal/mol) para os compostos barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir, quando interagindo com a enzima Mpro do SARS-CoV-2, tanto em sua forma monomérica (6LU7) quanto dimerizada nos sítios de ligação A e B (6M2Q). São apresentados os valores das energias de van der Waals (VDWAALS), energia eletrostática (EEL), energia de solvatação polar (EGB) e apolar (ESURF), energia total em fase gasosa (GGAS), energia total de solvatação (GSOLV) e a energia total de ligação (TOTAL) para cada cenário.

Energy	BARBATUSOL	BRUSSONOL	KOMAROVIQUINONA	NIRMATRELVIR
MONOMER 6LU7 (kcal/mol)				
VDWAALS	-26,98	-30,67	-37,79	-37,65
EEL	-12,37	-8,48	-12,24	-25,22
EGB	18,26	15,43	23,19	37,07
ESURF	-3,54	-3,74	-4,37	-5,38
GGAS	-39,35	-39,15	-50,03	-62,87
GSOLV	14,72	11,70	18,82	31,69
TOTAL	-24,64	-27,45	-31,21	-31,18
DIMER 6M2Q SITE A (kcal/mol)				
VDWAALS	-41,62	-35,89	-42,72	-48,34
EEL	-11,96	-9,83	-20,67	-21,01
EGB	20,04	23,70	31,45	42,03
ESURF	-4,86	-4,64	-5,30	-6,29
GGAS	-53,58	-45,72	-63,39	-69,35
GSOLV	15,19	19,06	26,16	35,74
TOTAL	-38,39	-26,66	-37,23	-33,61
DIMER 6M2Q SITE B (kcal/mol)				
VDWAALS	-35,05	-32,69	-38,40	-47,88
EEL	-3,15	-9,46	-14,15	-17,03
EGB	16,28	17,98	30,54	40,55
ESURF	-4,39	-4,10	-4,92	-6,53
GGAS	-38,20	-42,15	-52,55	-64,91
GSOLV	11,89	13,88	25,61	34,02
TOTAL	-26,31	-28,28	-26,94	-30,89

Fonte: elaborada pelo autor.

Neste estudo, simulações QM/MM foram realizadas utilizando os softwares GROMACS e CP2K para explorar as interações entre a proteína Mpro do SARS-CoV-2 e os ligantes barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir.

A energia eletrostática QM/MM (Mecânica Quântica/Mecânica Molecular) reflete as interações eletrostáticas entre a região quântica (ligante) e a região clássica (proteína e solvente). Esse componente é crucial para compreender a estabilidade do complexo proteína-

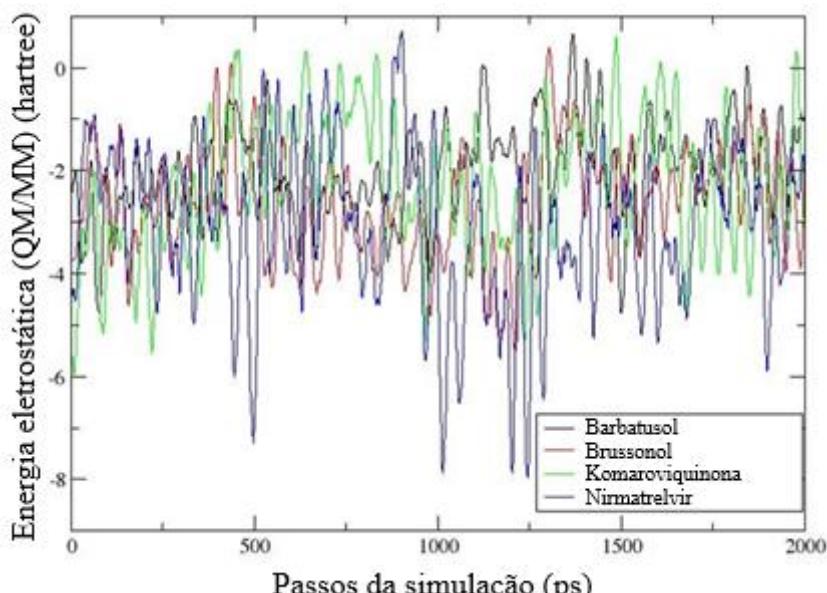
ligante e as forças que regem a ligação no sítio ativo. O gráfico 2 apresenta a evolução da energia eletrostática QM/MM ao longo das simulações para cada ligante.

Ao analisar os valores mínimo, máximo e médio das energias eletrostáticas QM/MM na estrutura monomérica (PDB ID 6LU7), é observado que nirmatrelvir exibe a interação mais favorável, com um valor médio de -3,07 hartree, seguido por brussonol (-2,63 hartree), komarovquinona (-2,28 hartree) e barbatusol (-1,99 hartree). Os valores mínimos reforçam essa tendência: nirmatrelvir (-7,96 hartree), komarovquinona (-5,95 hartree), brussonol (-5,53 hartree) e barbatusol (-4,76 hartree). Esses dados sugerem que o nirmatrelvir possui maior afinidade eletrostática com a proteína Mpro.

Além disso, a análise de valores positivos revelou que brussonol apresentou o menor número de interações desfavoráveis (18 ocorrências), seguido por nirmatrelvir (27), barbatusol (34) e komarovquinona (71). Essa menor incidência de interações positivas indica que brussonol pode ter uma dinâmica de interação mais estável ao longo da simulação. Por outro lado, a maior amplitude de flutuações energéticas observada para o nirmatrelvir sugere interações mais dinâmicas e adaptativas com o sítio ativo.

Embora as simulações QM/MM ofereçam insights detalhados sobre as interações moleculares, é importante destacar que esses resultados são obtidos em condições computacionais e, portanto, precisam ser validados experimentalmente. Os valores apresentados fornecem uma base para a investigação de mecanismos moleculares.

Gráfico 2 - Gráfico com as etapas de simulação versus energia eletrostática QM/MM para os quatro ligantes: barbatusol, brussonol, komarovquinona e nirmatrelvir. O gráfico representa a energia de interação eletrostática dos compostos com a proteína Mpro do SARS-CoV-2 ao longo das etapas de simulação.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.2. Estudo de Caso II: Inibição da Proteína Spike

4.2.1. Caracterização do Sítio de Ligação

A proteína spike (S) do SARS-CoV-2 desempenha um papel fundamental na entrada viral nas células hospedeiras, tornando-a um alvo principal para intervenções terapêuticas. Este estudo se concentrou na identificação dos principais locais de ligação na proteína spike da variante SARS-CoV-2 Omicron, particularmente em sua subvariante BA.2. A proteína spike é um trímero composto por 1.273 aminoácidos (aa) e é dividida em várias regiões distintas:

- Um peptídeo sinal (aa 1–13), que normalmente está ausente nas estruturas de PDB,
- A subunidade S1 (resíduos 14-685), responsável pela ligação ao receptor, incluindo o domínio N-terminal (NTD) (resíduos 14-305) e o domínio de ligação ao receptor (RBD) (resíduos 319-541),
- A subunidade S2 (resíduos 686-1273), responsável pela fusão da membrana, contém regiões críticas como o peptídeo de fusão (FP) (resíduos 788-806), repetições heptad HR1 e HR2 (resíduos 912-984 e 1163-1213), o domínio transmembrana (TM) (resíduos 1213-1237) e o domínio citoplasmático (resíduos 1237-1273).

A estrutura PDB 8D55 foi selecionada para este estudo, representando a conformação fechada da proteína spike. Esta estrutura tinha os seguintes resíduos 24 ao 26, 73 ao 79, 250 ao 256 e 681 ao 686 ausentes. Usando o servidor Swiss-Model, esses resíduos foram adicionados de volta ao modelo, completando a estrutura com SER24, TYR25, THR26, THR73, LYS74, ARG75, PHE76, ASP77, ASN78, PRO79, ASP250, SER251, SER252, SER253, GLY254, TRP255, THR256, ALA681, ARG682, SER683, VAL684, ALA685 e SER686. Com essas adições, a estrutura final de cada monômero no trímero foi completada, englobando os resíduos GLN14 ao PRO1159. Este modelo foi então usado para simulações subsequentes de docking e dinâmica molecular (MD) (Waterhouse et al, 2018).

Para refinar a busca por potenciais locais de ligação, a literatura foi consultada. Notavelmente, Nurcahyaningtyas et al. demonstraram em seu estudo que os resíduos primários com os quais os compostos bioativos de invertebrados marinhos indonésios interagem, por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, incluem LEU290, ASP291, PRO292, LEU293, SER294, ASN603, GLN604, VAL605, ALA606, VAL607, THR629, TRP630, ARG631, VAL632, TYR633, SER634, GLY636, SER637, ASN638, GLY649, ALA650,

GLU651, GLN674, SER680, ALA681, SER682, SER688 e ILE689. Utilizando a estrutura PDB ID 7QO7 da proteína spike da variante SARS-CoV-2 Omicron, eles identificaram essas interações.

De acordo com Zhang et al., várias mutações no domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína spike da subvariante BA.2 da Ômicron influenciam significativamente sua afinidade pelo receptor ACE2 e sua interação com anticorpos neutralizantes. As mutações N501Y, Q493R e Q498R aumentam a afinidade criando contatos adicionais com o receptor, enquanto K417N e E484A reduzem essa afinidade eliminando interações iônicas essenciais. Mutações específicas de BA.2, como D405N, R408S e T376A, localizadas fora do sítio de ligação da ECA2, têm impacto mínimo na ligação ao receptor. Outras mutações, incluindo K417N, S477N, T478K, E484A, Q493R, Q498R e N501Y, presentes em BA.1 e BA.2, são críticas para os principais contatos com anticorpos RBD-2, explicando a perda de ligação e neutralização pela maioria desses anticorpos. Além disso, a mutação S373P enrijece a cadeia polipeptídica local, causando uma mudança em uma hélice curta e uma rotação do glicano ligado a N em Asn343, estabilizando sua conformação rotacionada. Essas mudanças estruturais não apenas afetam diretamente a ligação da ACE2, mas também têm implicações significativas para a neutralização de anticorpos, contribuindo para a evasão imunológica observada na subvariante BA.2.

A análise do nível de confiança usando o servidor GRASP (<https://grasp.ufv.br/>) revelou diferenças notáveis em resíduos específicos dentro das cadeias A, B e C. Valores iguais ou superiores a 0,4 foram considerados muito bons e valores iguais ou superiores a 0,35 foram considerados bons. O resíduo THR412 destacou-se com a maior pontuação, atingindo 0,48 na cadeia A. Resíduos como TRP101, PHE154, ASN331, THR412 e TYR671 demonstraram bons níveis de confiança nas três cadeias, com valores superiores a 0,4. Outros resíduos, incluindo TRP61, PHE89, ASN119, THR121, PHE130, PHE132, THR601, THR675, ARG762, PHE799, PHE924, SER1027, PHE1072, PHE1153 e SER1158, apresentaram valores muito semelhantes nas três cadeias, com níveis de confiança acima de 0,35. Alguns resíduos, como THR111, SER356, PHE453, TYR486 e SER1052, apresentaram valores acima de 0,35 nas cadeias A e B. Por outro lado, resíduos como HIS63, THR92, PHE103, GLN503, HIS678 e SER743 tiveram bom desempenho especificamente nas cadeias A e C. Os resíduos PRO54, ARG75, THR205 e SER1034 tiveram melhores resultados nas cadeias B e C. Além disso, resíduos como HIS66, THR70, THR164, TRP350, PHE374, PHE397, CYS535, PHE715, CYS757, PHE895, GLN1008 e ASN1122 apresentaram bons resultados na cadeia A, enquanto PRO488, ASN529

e SER971 se destacaram na cadeia B, e PHE339, CYS358, PRO370, TYR492 e ALA1019 se destacaram na cadeia C.

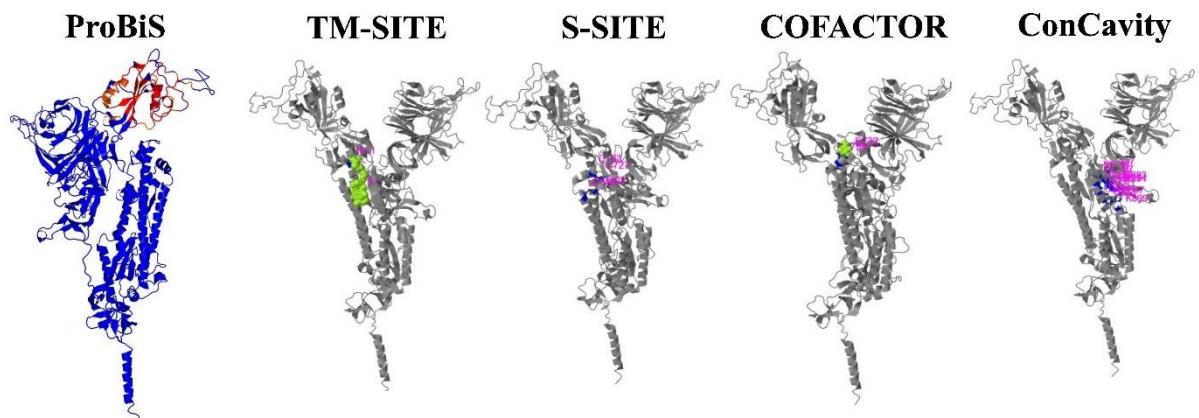
A análise realizada pelo servidor COACH, conforme apresentado na tabela 4, fornece várias previsões de sites ativos. Os resíduos de aminoácidos consistentemente identificados pelo COFACTOR incluem os resíduos 732 e 736; por TM-SITE, resíduos 981 e 992; por S-SITE, resíduos 722, 727, 733 e 744; e por ConCavity, que identificou múltiplas cavidades, sendo as mais relevantes os resíduos 287, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 647, 809, 933, 934, 937, 940, 941 e 944.

Os resultados obtidos do servidor PRoBiS indicaram duas categorias de resíduos conservados, conforme mostrado na figura 8. Os resíduos laranja incluem LEU332, CYS333, ASP336, GLU337, CYS358, VAL359, ALA360, ASP361, TYR362, SER363, VAL364, LEU365, PHE374, SER380, PRO381, THR382, LYS383, LEU384, ASN385, ASP395, PHE395 7, ILE399, ASN414, ASP424, ASP425, PHE426, ILE431, ALA432, ASN436, TYR446, ASN457, GLU468, ILE469, LEU489, SER491, GLY499, VAL500, GLY501, HIS502, GLN503, VAL507 e LEU510. Os resíduos vermelhos compreendem PRO334, PHE335, VAL338, PHE339, ASN340, ALA341, THR342, ARG343, PHE344, ALA345, SER346, TYR348, ALA349, TRP350, ARG352, LYS353, ARG354, ILE355, SER356, LYS375, CYS376, TYR377, GLY378, VAL379, VAL392, TYR392, TYR399 3, ALA394, SER396, GLY401, ASN402, GLU403, VAL404, SER405, GLN406, ILE407, ALA408, PRO409, GLY410, GLN411, THR412, GLY413, ILE415, ALA416, ASP417, TYR418, LEU422, PRO423, CYS429, VAL430, TRP433, ASN434, SER435, LEU438, ASP439, SER440, ASN445, ASN447, TYR448, TYR450, ARG451, LEU452, ARG454, SER456, LEU458, LYS459, PRO460, PHE461, GLU462, ARG463, ASP464, ILE465, SER466, THR467, PRO488, TYR492, TYR505, ARG506, VAL508, SER511 e PHE512. Esses resíduos, conforme indicado pelo PRoBiS, representam as regiões mais conservadas da proteína, sendo os resíduos vermelhos os mais conservados e, portanto, os mais prováveis de pertencer ao sítio de ligação do ligante.

Com base na análise coletiva de dados estruturais, pontuações de confiança, revisão da literatura e previsões de bioinformática, três regiões da proteína spike foram selecionadas para estudos adicionais de dinâmica molecular e docking: LEU290-SER294, ASN603-VAL607 e THR629-ILE689. Essas regiões englobam resíduos críticos para a interação da proteína com ligantes e foram escolhidas como potenciais sítios de ligação para os três ligantes estudados: mefloquina, komaroviquinona e brussonol. A seleção dessas regiões de ligação foi guiada por

seu envolvimento nas principais ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, bem como sua relevância estrutural para a estabilidade e função geral da proteína spike.

Figura 8 - Identificação de resíduos-chave na proteína spike SARS-CoV-2 (PDB ID: 8D55) usando vários servidores de previsão de bioinformática. O servidor ProBiS (extrema esquerda) destaca os resíduos conservados, essenciais para a função e interação das proteínas, em laranja e vermelho. O servidor TM-SITE (segundo da esquerda) identifica resíduos críticos envolvidos nas interações de ligação, marcados em verde. O S-SITE (meio) prevê resíduos de interação significativos, exibidos em magenta, enquanto o servidor COFACTOR (segundo da direita) destaca de forma semelhante os resíduos funcionalmente importantes, também em magenta. O servidor ConCavity (extrema direita) identifica possíveis cavidades de ligação com resíduos significativos mostrados em magenta.



Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Resíduos previstos do local de ligação para a proteína Spike do SARS-CoV-2 (PDB ID: 8D55) conforme identificado por vários métodos computacionais. A tabela lista os clusters de locais de ligação previstos, os métodos usados (SST: Site-Search Tool, COF: COFACTOR, TMS: TM-SITE, CON: ConCavity), PDB correspondentes, ligantes, pontuações C e os resíduos específicos identificados em cada local de ligação previsto.

CLUSTER	Método	PDB	Ligantes	Pontuação C	Resíduos previstos do local de ligação
Cluster 1	SST	1a5tA	BS01_ZN	0.30	722,727,733,744
	SST	1jr3A	BS01_ZN	0.31	722,727,733,744
	SST	1nuiA	BS01_ZN	0.30	722,727,733,744
Cluster 2	COF	3cmvG	BS06_ANP	0.48	278,279,281,282,283,284,296
	COF	3cmvB	BS06_ANP	0.50	278,279,281,282,283,284,296
	COF	3cmvC	BS06_ANP	0.48	279,281,282,283,284
Cluster 3	SST	3ufkA	BS17_FE	0.31	953,1135
	SST	1q08A	BS01_ZN	0.30	1016,1027
Grupo 4	TMS	3wmoS	BS06_BCL	0.31	981,992
	TMS	4dv3B	BS03_MG	0.32	988,989
Cluster 5	SST	4fmaI	BS01_MG	0.31	891,1020,1021
	SST	4fmaA	BS01_MG	0.31	891,102
Cluster 6	CON	NTAPP	NTAPP	0.58	287, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 647, 809, 933, 934, 937, 940, 941 e 944
Cluster 7	CON	NTAPP	NTAPP	0.38	502,525,533,551,552,555,556,557,571, 573
Cluster 8	COF	2b39B	BS01_BMA	0.71	732,736
Cluster 9	TMS	3fk7A	BS02_4DM	0.31	1009,1013
Cluster 10	TMS	4mhlA	BS04_ARF	0.31	1000,1003
Cluster 11	CON	NTAPP	NTAPP	0.14	709,71
Cluster 12	CON	NTAPP	NTAPP	0.28	949,952
Cluster 13	TMS	1q90M	BS01_BCR	0.29	993,997
Cluster 14	CON	NTAPP	NTAPP	0.25	942,987,990,991,994,998
Cluster 15	CON	NTAPP	NTAPP	0.25	258,275,282,300,614
Cluster 16	CON	NTAPP	NTAPP	0.24	714,812,845,847,849,851,854,1040,1042
Cluster 17	TMS	5hhjA	BS02,GLY	0.30	907,91
Cluster 18	SST	1zv8C	BS01_III	0.32	911, 912, 915, 919, 922, 923, 926, 929, 930, 933, 936, 937, 940, 943, 944 e 947
Cluster 19	SST	1ef0A	BS01_ZN	0.30	1032,1048,1066
Cluster 20	TMS	3c94A	BS03_MG	0.31	803,804

Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.2. Resultados de Docking Molecular

Os NAGs e glicanos desempenham um papel essencial na manutenção da estabilidade conformacional e da funcionalidade da glicoproteína SARS-CoV-2 Spike, além de facilitar os mecanismos de evasão imunológica. Na estrutura trimérica da proteína Spike (PDB ID 8D55), os 51 NAGs e glicanos apresentam diversos perfis de interação, com valores de energia de encaixe que variam de -6,9 kcal/mol a -4,5 kcal/mol (ver tabela 5). A inclusão dessas moléculas em simulações de dinâmica molecular (MD) assegura uma representação fiel do ambiente nativo da proteína, destacando sua relevância na preservação da integridade estrutural.

Tabela 5 - Resumo das Interações por Ligações de Hidrogênio, Interações Hidrofóbicas, Pontuações de Docking, Número Médio de Ligações de Hidrogênio por Quadro na DM, Distância Mínima Média na DM e RMSD (Ligante-Proteína) para os NAGs e Glicanos do PDB ID 8D55.

ID	Escore de encaixe (kcal/mol)	Interação por ligação de H (Docking)	Interações hidrofóbica (Docking)	Número médio de hbonds por tempo	Interação H-bond DM	Distância Mínima Média DM (Å)	RMSD (ligante-proteína) (Å)
L01	-5.7	ASN96 (A), ARG99 (A), ASN119 (A), GLU151 (A)	ALA120 (A), VAL140 (A), TRP149 (A), MET150 (A)	0.446	ASN119 (A), ALA120 (A), THR121 (A), GLU151 (A)	2.13	1.03
L02	-5.7	GLU129 (A), ASN161 (A), THR467 (B), ILE469 (B)	SER109 (A), LYS110 (A), SER466 (B), GLU468 (B), GLY479 (B)	1.597	ASN161 (A), ASN162 (A), THR467 (B)	1.93	1.31
L03	-6.6	THR111 (A), ASN231 (A), ARG454 (B), SER456 (B), ASN457 (B), ASP464 (B), SER466 (B), GLU468 (B)	THR105 (A), LYS110 (A), LYS455 (B), LEU458 (B), LYS459 (B)	1.042	THR105 (A), ASN231 (A), THR233 (A), ARG454 (B), LYS455 (B), SER456 (B)	1.95	1.03
L04	-5.6	LYS203 (A), PHE217 (A), SER218 (A),	ARG31 (A), TYR35 (A), THR205 (A),	0.441	ASN277 (A), GLU278 (A),	2.27	1.06

		ALA219 (A), THR283 (A)	PRO206 (A), PRO214 (A), GLU221 (A), THR281 (A), ILE282 (A)		ASN279 (A), LYS555 (B)		
L05	-5.4	ASN533 (A), SER588 (A), GLN833 (C), GLY835 (C)	VAL317 (A), CYX535 (A), VAL548 (A), CYX587 (A), THR615 (A), GLU616 (A), TYR834 (C)	2.294	ASN613 (A), THR615 (A), GLN833 (C)	1.91	1.48
L06	-5.3	THR713 (A), GLU915 (A), GLU1108 (A)	ASN714 (A), ASN916 (A), LYS918 (A), LEU919 (A), PHE1106 (A), TYR1107 (A), SER1120 (B), VAL1125 (B)	1.845	ASN714 (A), ASN922 (A), GLN923 (A), GLN1068 (A)	1.98	0.98
L07	-5.9	ASN922 (A), ASN925 (A), GLY929 (A), ASP933 (A), GLN932 (A)	ASN798 (A), GLN801 (A), PHE814 (A), SER926 (A), SER936 (A)	0.146	ASN798 (A), SER800 (A), GLN801 (A), ASN925 (A), GLN932 (A)	2.18	1.09
L08	-6.1	GLU699 (A), ASN700 (A), SER701 (A), ALA703 (A), GLN892 (C)	VAL702 (A), GLU1069 (A), LYS783 (C), GLN784 (C), TYR786 (C), ALA889 (C), ALA890 (C)	0.034	ASN1071 (A)	2.34	0.98
L09	-5.2	ASN916 (A), GLU915 (A), PRO1109 (A), GLN1110 (A), SER1120 (B)	PHE1100(A), PHE1106(A), GLU1108(A), GLY1121(B)	0.333	ASN1095(A), THR1097(A), HID1098(A)	2.11	1.10
L10	-4.8	CYX1123(A), ASP1124(A), VAL1126(A),	CYX1079 (A), HID1080 (A), GLY1082 (A)	0.017	ASN1131 (A)	2.47	0.98

		GLY1128(A), ILE1129(A), ASN1131(A)					
L11	-6.2	ARG99 (B), VAL140 (B), TRP149 (B), HID242 (B), ALA240 (B)	ILE97 (B), SER148 (B), MET150 (B), LEU241 (B)	0.587	ASN119 (B), THR121 (B), ASN122 (B), GLU151 (B)	2.11	1.09
L12	-5.6	ARG343 (C), PHE344 (C), ALA349 (C), ASN447 (C)	GLU129 (B), ALA345 (C), SER346 (C), TYR348 (C), ILE465 (C)	1.419	GLU129 (B), ASN161 (B), ASN162 (B), THR467 (C)	1.96	1.01
L13	-6.9	ASN231 (B), LYS455 (C), SER456 (C), LYS459 (C), GLU462 (C), SER466 (C), GLU468 (C)	LYS110 (B), THR111 (B), ARG454 (C), ASP464 (C)	0.774	THR105 (B), ASN231 (B), THR233 (B), ARG454 (C), LYS455 (C), SER456 (C)	2.04	0.98
L14	-5.4	SER43 (B), GLU278 (B), ASP840 (B), ARG844 (B), ASN553 (C), LYS555 (C)	ALA843 (B), LYS554 (C)	0.425	ASN277 (B), GLU278 (B), ASN279 (B), LYS555 (C)	2.20	1.03
L15	-5.6	GLN833 (A), ASN533 (B), SER588 (B), THR615 (B)	GLY835 (A), LEU838 (A), VAL317 (B), VAL548 (B), CYX587 (B), GLU616 (B), VAL619 (B)	0.621	GLN833 (A), ASN613 (B), THR615 (B)	2.06	0.95
L16	-5.4	GLU915 (B), ASN916 (B), LYS918 (B), GLU1108 (B), SER1120 (C), VAL1125 (C)	GLN917 (B)	1.317	ASN714 (B), ASN922 (B), GLN923 (B), GLN1068 (B)	2.03	1.02

L17	-5.7	ASN925 (B), SER926 (B), GLY929 (B), ASP933 (B)	ASN798 (B), GLN801 (B), PHE814 (B), ASN922 (B), GLN932 (B), SER936 (B)	0.031	ASN798 (B), GLN801 (B), GLN932 (B)	2.32	1.04
L18	-5.8	ALA890 (A), GLN892 (A), GLU699 (B), ASN700 (B), SER701 (B), ALA703 (B), ASN1071 (B)	LYS783 (A), GLN784 (A), TYR786 (A), ALA889 (A), VAL702 (B), GLU1069 (B)	0.300	SER708 (B), ASN1071 (B)	2.23	0.95
L19	-5.1	ASN916 (B), GLU915 (B), GLU1108 (B), PRO1109 (B), GLN1110 (B), SER1120 (C)	VAL912 (B), VAL1119 (C), GLY1121 (C)	0.194	ASN1095 (B), THR1097 (B), HID1098 (B)	2.15	1.05
L20	-5.1	CYX1123(B), ASP1124(B), VAL1126(B), GLY1128(B), ILE1129(B), ASN1131(B)	CYX1079(B), HID1080(B), GLY1082(B), ILE1127(B)	0.053	ASN1131 (B)	2.44	1.01
L21	-5.7	ASN96 (C), ASN119 (C), ARG99 (C), VAL140 (C), TRP149 (C), GLU151 (C), HID242 (C)	ALA120 (C), MET150 (C), THR121 (C)	0.482	ASN119 (C), ALA120 (C), THR121 (C), ASN122 (C), GLU151 (C)	2.12	1.07
L22	-5.8	ARG343 (A), SER346 (A), ALA349 (A), ASN351 (A)	ALA345 (A), TYR348 (A), ARG352 (A), ARG463 (A), THR164 (C),	0.796	TYR348 (A), THR467 (A), ASN161 (C), ASN162 (C)	2.02	0.90
L23	-6.4	ASP464 (A), SER466 (A), GLU468 (A),	ARG451 (A), ARG454 (A), TYR470 (A),	1.605	ARG454 (A), LYS455 (A), SER456 (A),	1.95	1.00

		ILE469 (A), THR105 (C), ASN231 (C),	THR106 (C), ARG234 (C)		THR105 (C), ASN231 (C), THR233 (C)		
L24	-5.8	ASN553 (A), SER43 (C), GLU278 (C), ARG844 (C)	LYS554 (A), LYS555 (A), SER42 (C), ASN279 (C), ASP840 (C), ALA843 (C)	0.442	LYS555 (A), ASN277 (C), GLU278 (C), ASN279 (C)	2.21	1.03
L25	-5.5	GLN833 (B), SER588 (C), THR615 (C)	TYR834 (B), GLY835 (B), VAL317 (C), CYX535 (C), VAL548 (C), CYX587 (C), GLU616 (C), VAL619 (C)	1.637	GLN833 (B), ASN613 (C), THR615 (C)	1.92	1.51
L26	-5.9	SER1120 (A), GLU915 (C), ASN916 (C), THR713 (C), TYR1107 (C)	ASN714 (C), LEU919 (C), GLN1068 (C), PHE1106 (C), GLU1108 (C), PRO1109 (C)	1.266	ASN714 (C), ASN922 (C), GLN923 (C), GLN1068 (C)	2.02	0.95
L27	-5.6	GLY796 (C), ASN798 (C), GLN801 (C), ASN922 (C), ASN925 (C), GLY929 (C), GLN932 (C)	TYR793 (C), PHE797 (C), SER926 (C), ILE928 (C)	0.094	ASN798 (C), SER800 (C), GLN801 (C), GLN932 (C)	2.23	0.94
L28	-6.5	ALA890 (B), GLN892 (B), ASN700 (C), SER701 (C), ALA703 (C), GLU1069 (C),	LYS783 (B), GLN784 (B), ALA889 (B), GLU699 (C), VAL702 (C), ALA710 (C),	0.318	SER708 (C), ASN1071 (C)	2.25	0.92
L29	-5.4	SER1120 (A), GLY1121 (A), GLU915 (C), ASN916 (C)	THR713 (C), TYR1107 (C), GLU1108 (C),	0.083	ASN1095 (C), THR1097 (C), HID1098 (C)	2.17	0.97

			PRO1109 (C), GLN1110 (C)				
L30	-5.2	ASN707 (C), GLY1096 (C), TRP1099 (C), ASN1131 (C), ASN1132 (C)	THR1073(C), SER1094(C), THR1097(C), GLY1128(C), VAL1130(C)	0.034	ASN1131 (C)	2.45	1.03
L31	-4.5	PHE55 (A), ARG270 (A), ALA289 (A), LEU290 (A), ARG631 (A), VAL632 (A)	PRO54 (A), THR629 (A), TRP630 (A)	0.188	TYR25 (A), ASN58 (A)	2.29	1.16
L32	-5.9	PRO327 (A), ILE329 (A), SER527 (A)	PHE326 (A), ASN328 (A), VAL359 (A), CYX522 (A), GLY523 (A), PRO524 (A), LYS525 (A), LYS526 (A), GLN577 (A)	0.381	ASN328 (A), THR330 (A), GLN577 (A)	2.20	1.09
L33	-4.8	ARG343 (A), ALA345 (A), ASN351 (A), SER396 (A)	VAL338 (A), PHE344 (A), LYS353 (A)	0.000	-	2.06	1.27
L34	-4.8	ARG343 (A), ALA345 (A), ASN351 (A), SER396 (A)	VAL338 (A), PHE344 (A), LYS353 (A)	0.400	ASN600 (A), THR601 (A)	2.27	1.39
L35	-4.8	GLN604 (A), GLY649 (A), GLU651 (A), GLN674 (A), ARG680 (A), SER688 (A), ILE689 (A)	ASN638 (A), ALA650 (A)	0.616	ASN654 (A)	2.15	1.17
L36	-4.9	ASN706 (A), ALA896 (C)	TYR704 (A), ASN707 (A), ALA1075 (A),	0.295	ASN706 (A), TYR793 (C)	2.17	1.31

			PRO1076 (A), GLY1128 (A), TYR793 (C), GLY795 (C), PRO894 (C), PHE895 (C), MET897 (C),				
L37	-4.6	HID1156(A), THR1157(A), PRO1159(A), PRO1159(B)	HID1156(B), THR1157(C), HIE1156(C), PRO1159(C)	0.140	ASN1155 (A), SER1158 (A)	2.32	1.45
L38	-4.7	ASN58 (B), THR60 (B), VAL264 (B), TYR266 (B)	TYR25 (B), VAL59 (B), GLY265 (B)	0.100	TYR25 (B), ASN58 (B)	2.38	1.18
L39	-5.8	PRO327 (B), ILE329 (B), SER527 (B)	PHE326 (B), ASN328 (B), THR330 (B), VAL359 (B), CYX522 (B), LYS525 (B), LYS526 (B), GLN577 (B),	0.601	ASN328 (B), GLN577 (B)	2.16	1.11
L40	-4.9	TRP433 (B), ASN434 (B), SER435 (B), ARG506 (B)	PHE339 (B), ASN340 (B), PRO370 (B), PHE372 (B)	0.866	GLU337 (B), ASN340 (B)	2.01	1.26
L41	-4.5	LYS307 (B), GLY598 (B), THR601 (B), ASP660 (B), SER670 (B), TYR671 (B)	PRO597 (B)	0.214	ASN600 (B), THR601 (B)	2.29	1.39
L42	-4.9	ASN638 (B), GLY649 (B), GLU651 (B), GLN674 (B), ILE689 (B)	GLN604 (B), VAL605 (B), SER688 (B)	0.695	ASN654 (B)	2.11	1.19

L43	-4.9	ASN706 (B), THR1074 (B), GLY1128 (B)	TYR793 (A), GLY795 (A), ALA896 (A), MET897 (A), GLN917 (A), ASN707 (B), ALA1075 (B), PRO1076 (B), ILE1127 (B)	0.122	ASN706 (B), TYR793 (A)	2.19	0.98
L44	-4.6	TYR1152(B), ASN1155(B), HID1156(B), PHE1153(C), LYS1154(C)	THR1157 (C)	0.109	TYR1152 (B), ASN1155 (B), LYS1154 (C)	2.37	1.37
L45	-4.8	ASN58 (C), THR60 (C), VAL264 (C), TYR266 (C)	TYR25 (C), VAL59 (C), GLY265 (C)	0.101	TYR25 (C), ASN58 (C),	2.34	1.17
L46	-5.9	PRO327 (C), ILE329 (C), SER527 (C)	PHE326 (C), ASN328 (C), THR330 (C), VAL359 (C), CYX522 (C), GLY523 (C), PRO524 (C), LYS525 (C), LYS526 (C), GLN577 (C)	0.519	ASN328 (C), GLN577 (C)	2.17	1.09
L47	-4.9	PRO370 (C), TRP433 (C), ASN434 (C), SER435 (C)	LEU438 (C), PHE339 (C), ASN340 (C), ARG506 (C)	0.505	GLU337 (C), ASN340 (C)	2.18	1.22
L48	-4.6	LYS307 (C), GLY598 (C), THR601 (C), ASP660 (C), SER670 (C), TYR671 (C)	PRO597 (C)	0.396	ASN600 (C), THR601 (C)	2.17	1.20

L49	-4.7	GLU651 (C), ASN654 (C), ASN655 (C), LYS676 (C), ARG680 (C)	VAL653 (C), GLN674 (C), THR675 (C)	0.607	ASN654 (C)	2.11	1.17
L50	-5.0	ASN706 (C), THR1074 (C), GLY1128 (C)	TYR793 (B), GLY795 (B), ALA896 (B), MET897 (B), GLN917 (B), ASN707 (C), ALA1075 (C), PRO1076 (C), ILE1127 (C)	0.054	TYR793 (B), ASN706 (C),	2.19	0.99
L51	-4.6	TYR1152(B), ASN1155(B), HID1156(B), PHE1153(C), LYS1154(C),	THR1157 (C)	0.211	ASN1155 (C), SER1158 (C)	2.30	1.42

Fonte: elaborada pelo autor.

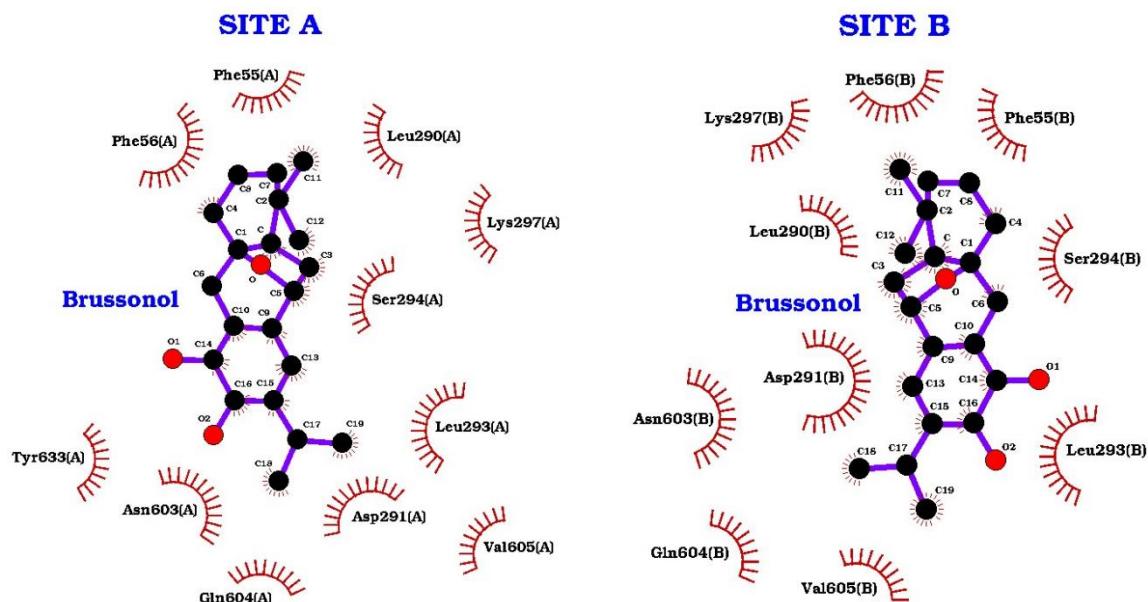
Os compostos naturais brussonol e komarovquinona foram avaliados em comparação com o fármaco de referência mefloquina. O brussonol apresentou energias de ligação de -7,4 kcal/mol nos sítios A e B, e -7,3 kcal/mol no sítio C. Já a komarovquinona exibiu valores de -7,3 kcal/mol nos sítios A e C, e -7,6 kcal/mol no sítio B. Por sua vez, a mefloquina registrou energias de ligação de -7,4 kcal/mol nos sítios A e C, e -7,5 kcal/mol no sítio B. Esses resultados evidenciam que brussonol e komarovquinona possuem afinidades de ligação comparáveis ou superiores às da mefloquina, ressaltando seu potencial como inibidores eficazes da proteína spike da variante Omicron BA.2 em estudo *in silico*.

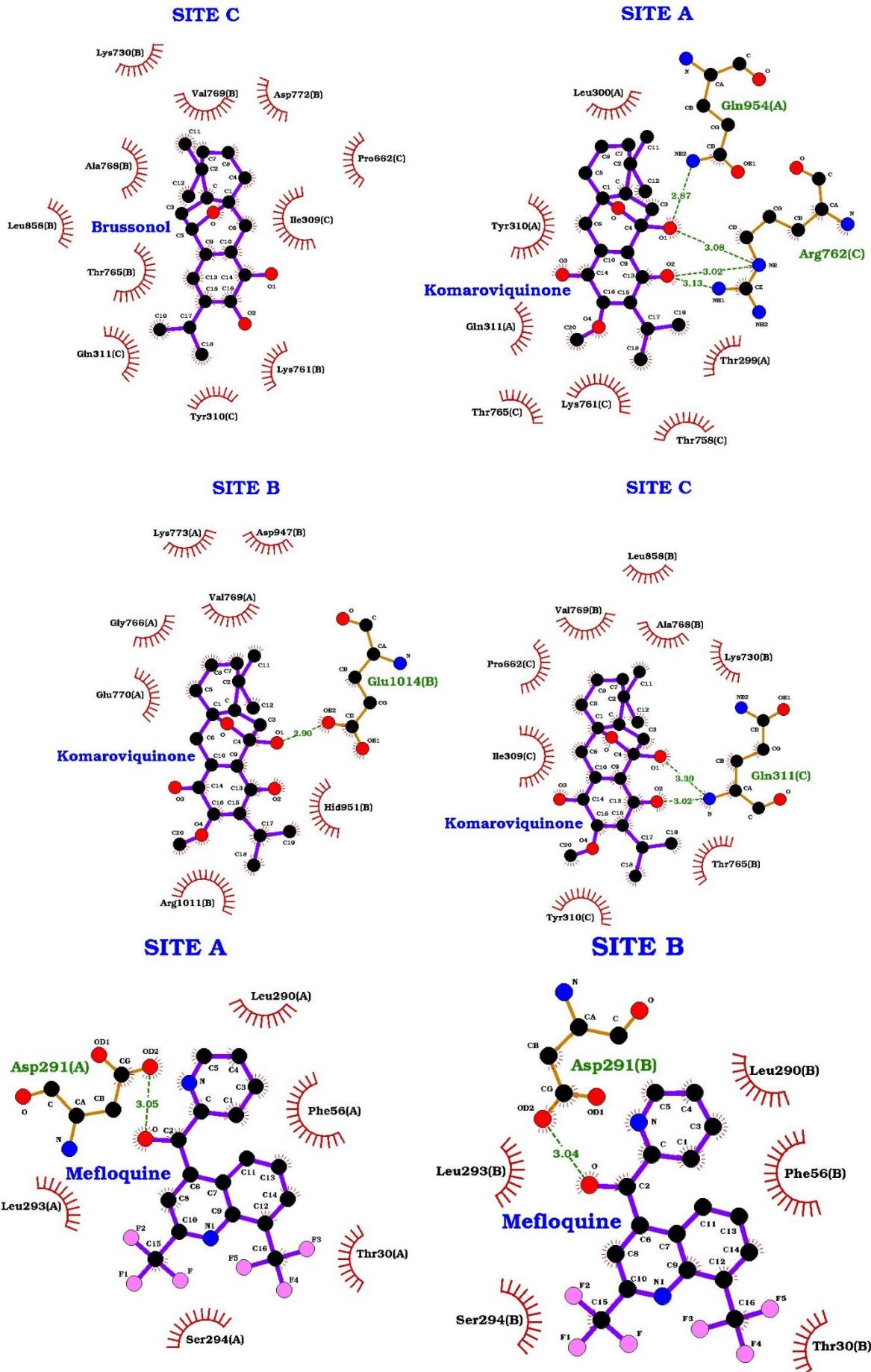
A figura 9 apresenta as interações específicas entre cada ligante e os principais resíduos nos três sítios de ligação identificados. O brussonol destacou-se por interagir predominantemente por meio de interações hidrofóbicas com resíduos como LEU290 (A), ASP291 (A), ASN603 (A) e GLN604 (A) em diversos sítios. Já a komarovquinona, além de interações hidrofóbicas, formou ligações de hidrogênio com resíduos como GLN954 (A) e ARG762 (C), indicando um potencial para interações mais robustas em determinados sítios. A mefloquina, utilizada como composto de referência, exibiu interações similares nos três sítios. Os padrões de interação ressaltam as características únicas de ligação do brussonol e da

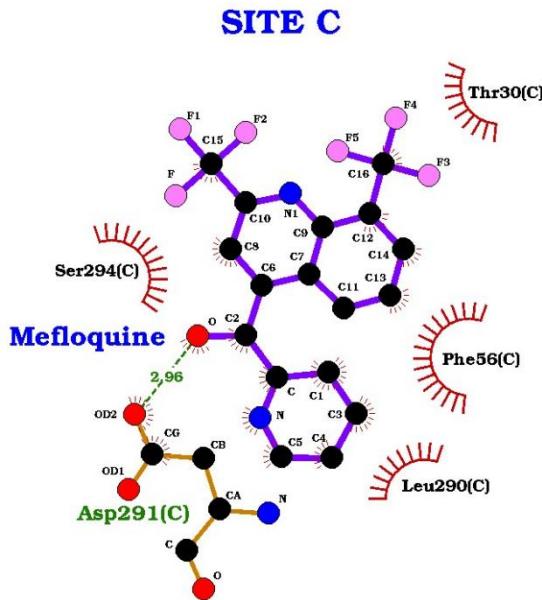
komaroviquinona, que interagiram com resíduos localizados em diferentes monômeros dentro de um único sitio, um comportamento não identificado nas interações da mefloquina.

Os resultados de docking demonstram que o brussonol e a komaroviquinona interagem com resíduos pertencentes a duas cadeias distintas em diversos sítios de ligação. O brussonol, por exemplo, apresentou interações com as cadeias B e C no sítio C, enquanto a komaroviquinona exibiu interações entre cadeias em todos os três sítios analisados. Esses achados ressaltam a importância do uso da forma trimérica da proteína spike em simulações de acoplamento molecular e dinâmica molecular, uma vez que esta abordagem fornece uma representação mais abrangente e precisa da dinâmica das interações proteicas. A forma trimérica permitiu identificar essas interações complexas entre monômeros, as quais são fundamentais para a compreensão detalhada da função da proteína e para o desenvolvimento racional de potenciais inibidores.

Figura 9 - Interação dos ligantes brussonol, komaroviquinona e mefloquina com os principais resíduos da proteína Spike da variante SARS-CoV-2 BA.2 nos locais A, B e C, gerados usando o programa LIGPLOT. A figura destaca as ligações de hidrogênio (linhas tracejadas verdes), com as distâncias mostradas ao longo da linha verde em angstroms (\AA) e interações hidrofóbicas (semicírculos vermelhos) entre cada ligante e os resíduos correspondentes em cada local de ligação. Para maior clareza, os nomes dos resíduos, seus números e respectivos monômeros são indicados entre parênteses, por exemplo, Asp291 (C) corresponde ao resíduo de aspartato numerado 291 no monômero C.







Fonte: elaborada pelo autor.

4.2.3. Resultados das Simulações de Dinâmica Molecular

A análise do desvio quadrático médio (RMSD) foi conduzida para avaliar a estabilidade estrutural da proteína spike em complexos com os ligantes mefloquina, brussonol e komarovquinona ao longo de simulações de 100 ns. Os valores médios de RMSD para o brussonol (0,517 Å) e a komarovquinona (0,514 Å) mostraram-se muito próximos ao controle da proteína em água (0,513 Å), indicando que esses compostos naturais preservam a estabilidade estrutural da proteína. Em contrapartida, a mefloquina apresentou um RMSD um pouco superior (0,522 Å), sugerindo uma variação conformacional. Esses resultados sugerem que brussonol e komarovquinona estabilizam um pouco mais a estrutura da proteína em comparação com a mefloquina (ver gráfico 3).

Os valores de RMSD ligante-proteína são indicadores cruciais da capacidade de cada ligante em manter sua pose de ligação ao longo das simulações de dinâmica molecular. Entre os compostos naturais, a komarovquinona demonstrou a interação mais estável com a proteína spike, apresentando valores de RMSD ligante-proteína de 0,77 Å no local A, 0,80 Å no local B e 0,89 Å no local C. Esses resultados sugerem que a komarovquinona forma um complexo forte e estável com a proteína spike em todos os sítios de ligação, apontando para seu potencial promissor como um inibidor eficaz.

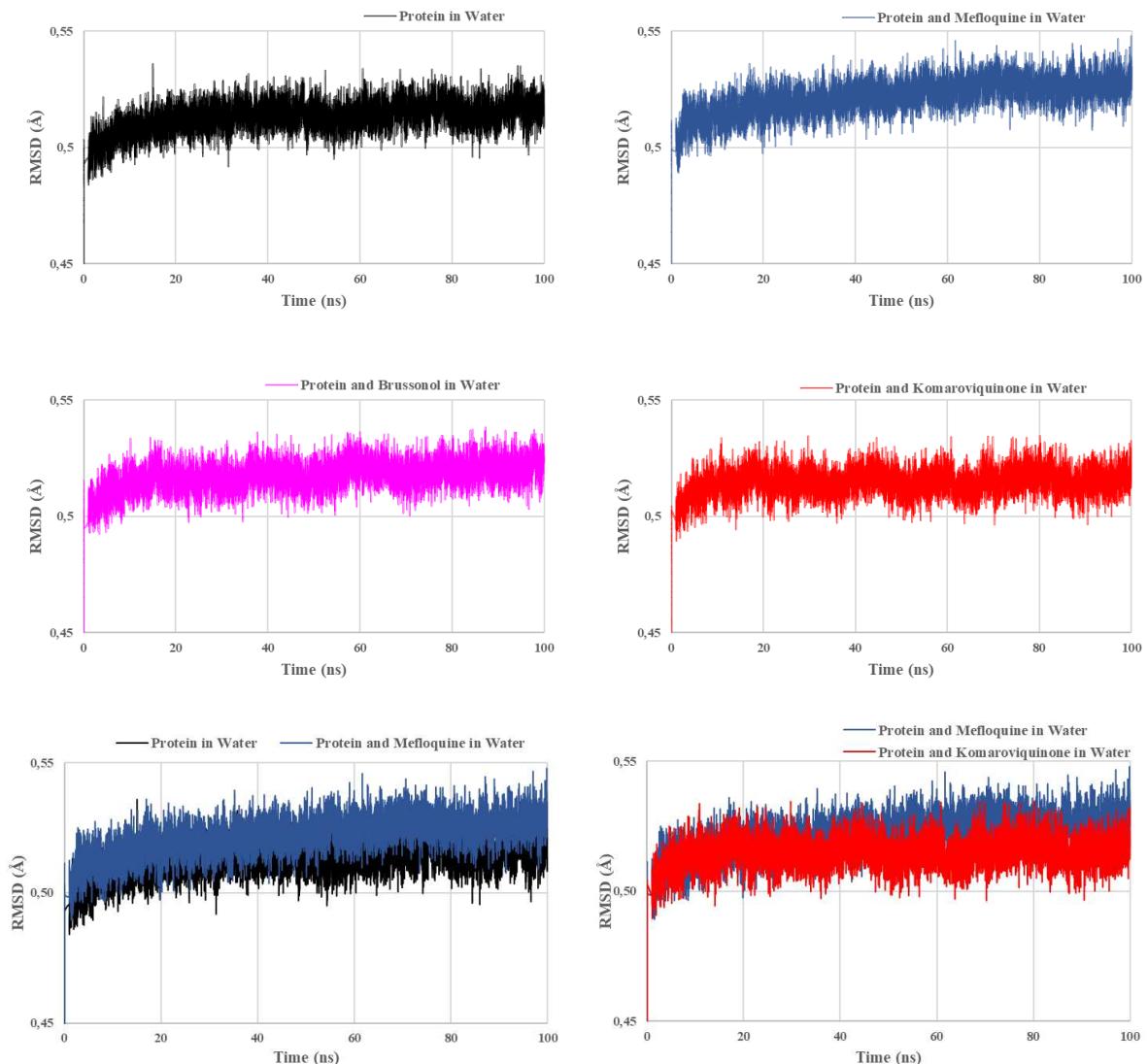
O composto de referência, mefloquina, exibiu valores de RMSD ligeiramente superiores, registrando 0,96 Å, 0,92 Å e 0,71 Å nos locais A, B e C, respectivamente. Apesar de indicar uma pose de ligação relativamente estável, esses valores sugerem uma interação

ligeiramente menos consistente em comparação à komarovquinona, especialmente nos locais A e B. Por outro lado, o brussonol apresentou maior variação na posição de ligação, o que pode refletir uma interação menos estável com a proteína spike.

Em contraste, os N-acetilglucosaminas (NAGs) e glicanos, presentes na estrutura cristalográfica da proteína spike do SARS-CoV-2 (PDB ID 8D55), apresentaram valores de RMSD superiores a 1 Å nas simulações. Por exemplo, os ligantes L02, L05 e L25 apresentaram RMSD de 1,31 Å, 1,48 Å e 1,51 Å, respectivamente, indicando maior movimento em relação às suas posições iniciais de ligação. No entanto, estudos experimentais *in vitro* demonstram que esses NAGs e glicanos permanecem ligados de forma estável à proteína spike, contribuindo para sua estabilidade estrutural e integridade funcional. Isso indica que, mesmo com valores elevados de RMSD observados nas simulações, a estabilidade geral desses ligantes é mantida em um contexto biológico.

Ao comparar os resultados, os valores mais baixos de RMSD da komarovquinona em todos os sítios sugerem uma estabilidade ainda maior nos sítios de ligação em relação aos NAGs e glicanos, que são reconhecidos como componentes estruturalmente estáveis da proteína spike. A menor variação da komarovquinona, especialmente nos locais A e B, reforça a hipótese de que este composto mantém uma interação altamente estável com a proteína spike, potencialmente contribuindo para uma inibição eficaz da função viral. Assim, as simulações de dinâmica molecular indicam que a komarovquinona apresenta um potencial inibitório mais robusto em comparação à mefloquina e aos NAGs e glicanos incorporados estruturalmente, consolidando sua posição como uma candidata promissora ao desenvolvimento de medicamentos antivirais contra o SARS-CoV-2.

Gráfico 3 - Análise do RMSD da glicoproteína Spike da variante SARS-CoV-2 Omicron em complexo com os ligantes mefloquina, komarovquinona e brussonol em 100 ns de simulações de dinâmica molecular.



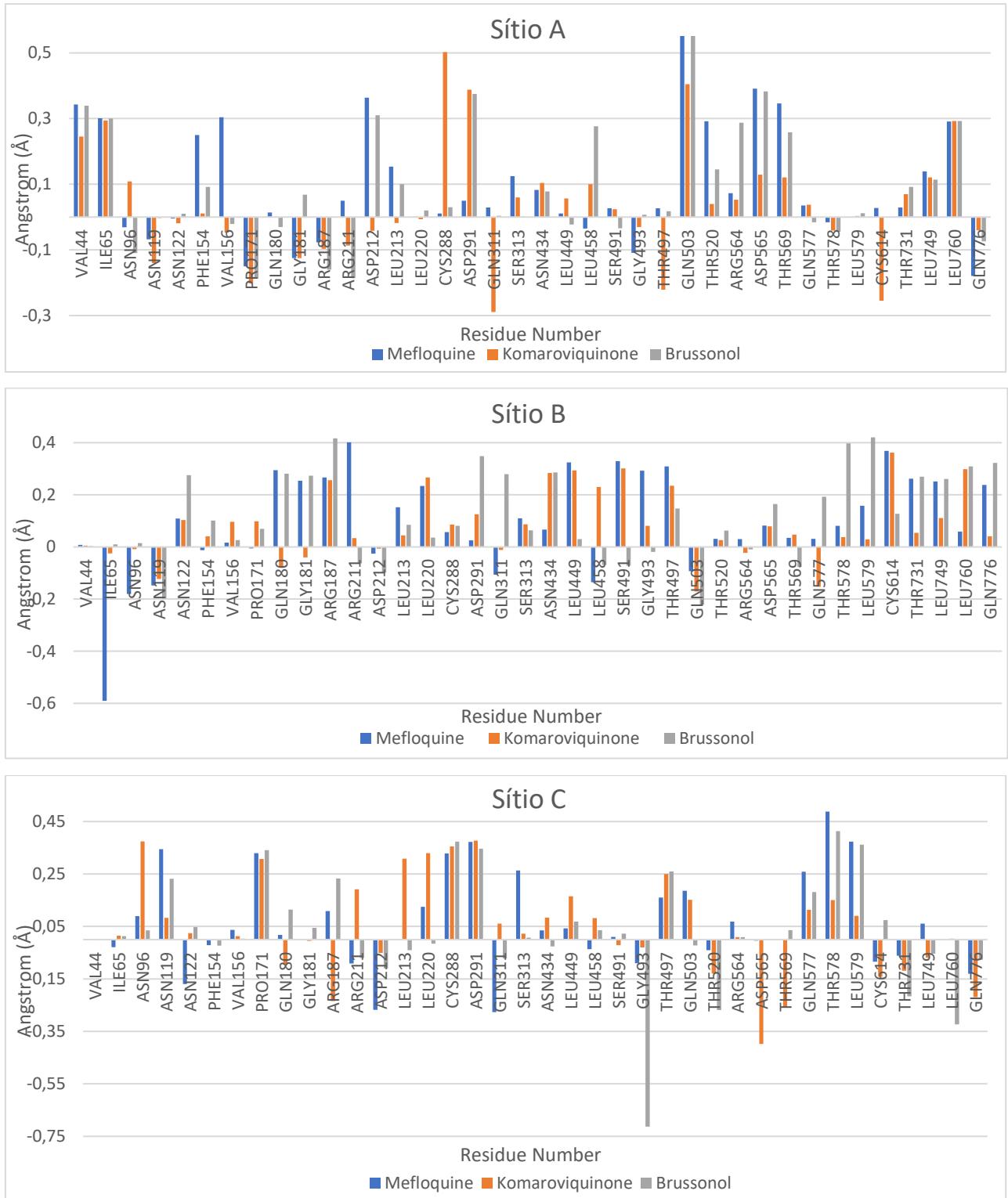
Fonte: elaborada pelo autor.

A Flutuação Quadrática Média (RMSF) mede as flutuações de cada resíduo ao longo do tempo em uma simulação de dinâmica molecular. Valores elevados de RMSF indicam que um resíduo sofre deslocamentos significativos em relação à sua posição média, enquanto valores baixos sugerem maior estabilidade do resíduo. Neste estudo, no gráfico 4 cada barra representa a diferença entre os valores de RMSF dos resíduos na simulação com apenas a proteína e os 51 NAGs e glicanos e os valores de RMSF das simulações com os ligantes mefloquina, komaroviquinona e brussonol. Um valor positivo indica que o RMSF do resíduo diminuiu na presença do ligante em comparação com a condição sem o ligante, sugerindo que o ligante estabiliza o resíduo, reduzindo sua mobilidade.

Notavelmente, os resíduos ILE65, GLN503 e LEU760, no sítio A, exibiram as reduções mais consistentes na flutuação para os três ligantes, indicando seu papel potencial na estabilização da proteína spike ao interagir com mefloquina, komaroviquinona e brussonol simultaneamente. No sítio C, os resíduos PRO171, CYS288 e ASP291 apresentaram as maiores reduções no RMSF, reforçando sua importância na manutenção da estabilidade estrutural da proteína spike. O resíduo ASP291 destacou-se pela redução consistente de flutuações no sítio C para todos os três ligantes, com o brussonol diminuindo as flutuações de ASP291 nos sítios A, B e C. Isso sugere que o brussonol exerce uma interação estabilizadora com ASP291, resíduo crítico para a integridade estrutural da proteína.

Além disso, a análise do RMSF revelou possíveis efeitos alostéricos, uma vez que vários resíduos distantes dos sítios de ligação apresentaram flutuações reduzidas. Essa observação indica que a ligação dos ligantes induz mudanças conformacionais que se propagam pela proteína, estabilizando regiões além dos sítios de ligação direta e contribuindo para a estabilidade geral da estrutura da proteína spike. Essa análise específica dos resíduos ressalta a capacidade dos ligantes de promover estabilização local e global na proteína spike, fornecendo informações relevantes sobre a dinâmica estrutural e o potencial inibitório desses compostos.

Gráfico 4 - Gráficos onde cada barra representa a diferença entre o RMSF do resíduo presente na simulação da proteína spike e 51 NAGs e glicanos em água, e o RMSF do mesmo resíduo porém na simulação da proteína spike, 51 NAGs e glicanos, e um ligante (mefloquina, komaroviquinona ou brussonol) na água. Os valores são dados em Ångströms (Å). As barras correspondentes à mefloquina são mostradas em azul, komaroviquinona em laranja e brussonol em cinza.



Fonte: elaborada pelo autor.

A análise da Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) e do raio de giro (R_g) proporcionou informações relevantes sobre a compactação estrutural e a estabilidade da proteína Spike na presença dos ligantes mefloquina, komaroviquinona e brussonol. Os resultados do SASA indicaram variações mínimas entre as cadeias, demonstrando que os ligantes não alteraram significativamente a exposição da proteína ao solvente. Por exemplo, o brussonol apresentou uma ligeira diminuição no SASA para a cadeia A em comparação com a mefloquina e a komaroviquinona, sugerindo que esses compostos preservam a integridade estrutural da proteína sem induzir mudanças conformacionais relevantes.

Os dados do raio de giro (R_g) corroboraram esses achados, mostrando uma consistência sutil em todas as condições avaliadas. Para a cadeia A, a proteína sem ligantes apresentou um R_g médio de 46,81 Å, enquanto na presença de mefloquina, komaroviquinona e brussonol, os valores médios de R_g foram de 46,81 Å, 46,82 Å e 46,81 Å, respectivamente. Tendência semelhante foi observada nas cadeias B e C, com um R_g consistente de 46,83 Å, independentemente da presença ou ausência dos ligantes estudados, indicando que a ligação desses compostos não impactou significativamente a compactação ou a distribuição estrutural da proteína. Para o trímero, o R_g médio foi de 50,89 Å, sem alterações significativas na presença dos ligantes.

Esses resultados demonstram que os ligantes mefloquina, komaroviquinona e brussonol preservam a compactação e a estabilidade estrutural geral da proteína Spike, sem provocar alterações estruturais substanciais. A manutenção da compactação, combinada com flutuações mínimas nos parâmetros SASA e R_g , sustenta a hipótese de que esses compostos, especialmente brussonol e komaroviquinona, possuem o potencial de atuar como inibidores contra a variante Omicron do SARS-CoV-2.

A distância mínima (MINDIST) entre os ligantes e a proteína fornece informações sobre a proximidade com que os ligantes se ligam à proteína Spike e está intimamente relacionada à formação de ligações de hidrogênio, que são cruciais para estabilizar as interações ligante-proteína. Os valores de MINDIST para mefloquina, komaroviquinona e brussonol mostram pequenas variações na proximidade de ligação, com a mefloquina geralmente se ligando mais estreitamente às cadeias A e B, enquanto a komaroviquinona se liga mais próxima à cadeia C. Especificamente, o MINDIST médio para mefloquina foi de 1,85 Å (cadeia A), 1,80 Å (cadeia B) e 2,16 Å (cadeia C). A komaroviquinona apresentou valores de 2,01 Å (cadeia A), 2,09 Å (cadeia B) e 2,03 Å (cadeia C), enquanto o brussonol exibiu distâncias ligeiramente maiores de 2,11 Å (cadeia A), 2,06 Å (cadeia B) e 2,12 Å (cadeia C). Esses valores sugerem que a mefloquina forma as interações mais próximas em geral, especialmente nas cadeias A e

B, enquanto a komaroviquinona se liga mais estreitamente na cadeia C. brussonol, embora mostre distâncias ligeiramente maiores, ainda forma interações próximas com a proteína, indicando seu potencial como um ligante estabilizador. Comparando esses resultados com os NAGs e glicanos na estrutura da proteína, as distâncias mínimas variaram de 1,91 Å a 2,47 Å, com L05 (1,91 Å) e L12 (1,96 Å) mostrando a ligação mais próxima. Distâncias maiores foram observadas para L10 (2,47 Å) e L30 (2,45 Å). Esses valores são ligeiramente mais altos, em média, em comparação com os ligantes estudados, particularmente para komaroviquinona e mefloquina, sugerindo que esses compostos podem ter afinidades de ligação mais fortes do que muitos dos NAGs e glicanos, que são conhecidos por estabilizar a estrutura da proteína Spike.

Em relação à formação de ligações de hidrogênio, a mefloquina formou uma média de 1,407 ligações de hidrogênio por período de tempo, o que foi maior do que o observado para a maioria dos NAGs e glicanos, onde apenas seis ligantes formaram mais de 1 ligação de hidrogênio por período de tempo. A komaroviquinona formou 0,589 ligações de hidrogênio por período de tempo, enquanto o brussonol formou 0,069 ligações de hidrogênio por período de tempo. Ambos os ligantes também demonstraram interações específicas com resíduos críticos, como ASN603 e ASP291, que desempenharam um papel duplo como doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio nos locais A, B e C. Isso sugere que a komaroviquinona e o brussonol interagem eficientemente com a proteína, particularmente na estabilização de resíduos-chave.

Em resumo, a análise dos padrões de ligação de hidrogênio e MINDIST indica que os ligantes estudados, especialmente mefloquina e komaroviquinona, exibem fortes interações de ligação e estabilização com a proteína spike SARS-CoV-2, muitas vezes superando os efeitos estabilizadores dos NAGs e glicanos nativos. Esses resultados destacam o potencial desses ligantes, particularmente a komaroviquinona, como inibidores eficazes, com sua capacidade de formar interações próximas e estáveis contribuindo para seu potencial inibitório contra a variante Omicron.

As energias de interação entre os ligantes mefloquina, komaroviquinona e brussonol com a glicoproteína Spike trimerizada do SARS-CoV-2 foram calculadas e estão detalhadas nas tabelas 6 e 7. Essas análises são cruciais para avaliar a afinidade de ligação de cada composto nos três principais sítios de ligação (A, B e C) da proteína spike. Os resultados incluem tanto as energias totais de interação quanto as contribuições específicas de interações de Coulomb de curto alcance (Coul-SR) e Lennard-Jones (LJ-SR) (ver tabela 6), bem como componentes detalhados de van der Waals, energia eletrostática e de solvatação (ver tabela 7).

No Sítio A, a komaroviquinona destacou-se com a energia de interação total mais negativa (-39,19 kcal/mol), superando a mefloquina (-38,57 kcal/mol), o que sugere uma

afinidade de ligação superior. Já o brussonol apresentou uma energia total menos negativa (-24,29 kcal/mol), indicando uma ligação global mais fraca; no entanto, suas interações hidrofóbicas robustas, evidenciadas pelas contribuições de Lennard-Jones, indicam um potencial considerável de estabilização.

No Sítio B, a komaroviquinona também apresentou interações não covalentes expressivas, com contribuições de Lennard-Jones (-28,09 kcal/mol) superiores às da mefloquina (-20,59 kcal/mol). Apesar disso, a mefloquina mostrou uma energia de interação total mais negativa (-39,59 kcal/mol), denotando uma afinidade geral mais forte nesse sítio. O brussonol, com uma energia de interação total de -28,33 kcal/mol, manteve um perfil competitivo, embora inferior à mefloquina e komaroviquinona.

No Sítio C, a komaroviquinona exibiu a energia de interação mais negativa (-36,86 kcal/mol), superando a mefloquina (-28,90 kcal/mol), o que reforça sua afinidade de ligação superior neste local. O brussonol, com uma energia total de -24,06 kcal/mol, novamente apresentou contribuições favoráveis de Lennard-Jones, apesar de exibir afinidade geral inferior.

Os dados da tabela 7 complementam essas descobertas, apresentando as contribuições detalhadas das interações de van der Waals e solvatação. A komaroviquinona apresentou consistentemente a energia de ligação mais negativa em todos os sítios, impulsionada por interações de van der Waals. No Sítio A, sua energia de ligação foi de -26,03 kcal/mol, enquanto a mefloquina e o brussonol registraram valores de -19,47 kcal/mol e -14,64 kcal/mol, respectivamente. No Sítio B, a komaroviquinona manteve a liderança (-21,17 kcal/mol), superando a mefloquina (-19,85 kcal/mol) e o brussonol (-17,85 kcal/mol). No Sítio C, a komaroviquinona novamente apresentou a energia mais negativa (-24,32 kcal/mol), destacando-se em relação à mefloquina (-17,04 kcal/mol) e ao brussonol (-14,44 kcal/mol).

Esses resultados destacam o desempenho superior da komaroviquinona em termos de afinidade de ligação, especialmente em todos os três sítios de ligação. Suas interações robustas, particularmente impulsionadas pelas forças de van der Waals, sugerem um potencial considerável como inibidor da proteína Spike. Embora o brussonol demonstre menor afinidade de ligação geral, ele apresenta forte potencial de estabilização por interações não covalentes. A mefloquina, utilizada como referência, mostrou ligação robusta em todos os sítios, mas foi consistentemente superada pela komaroviquinona, especialmente no Sítio C, onde sua afinidade mais elevada reforça seu potencial como uma alternativa terapêutica promissora.

Tabela 6 - Energias de interação calculadas (kcal/mol) de mefloquina, komaroviquinona e brussonol com a glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 trimerizada, nos locais de ligação A, B e C (PDB ID: 8D55). Contribuições específicas das interações de Coulomb de curto alcance (Coul-SR) e interações de Lennard-Jones de curto alcance (LJ-SR) são apresentadas, bem como a energia total de interação (TOTAL) para cada composto e configuração.

	Mefloquina	Komaroviquinona	Brussonol
Sítio A (kcal/mol)			
Coul-SR	-17.53	-6.04	-0.56
LJ-SR	-21.04	-33.15	-23.73
TOTAL	-38.57	-39.19	-24.29
Sítio B (kcal/mol)			
Coul-SR	-19.00	-4.31	-2.22
LJ-SR	-20.59	-28.09	-26.11
TOTAL	-39.59	-32.40	-28.33
Sítio C (kcal/mol)			
Coul-SR	-4.15	-4.53	-0.50
LJ-SR	-24.75	-32.33	-23.56
TOTAL	-28.90	-36.86	-24.06

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 7 - Energias de interação calculadas (kcal/mol) para mefloquina, komaroviquinona e brussonol com a glicoproteína Spike do SARS-CoV-2, nos locais de ligação A, B e C (PDB ID: 8D55). os valores das energias de van der Waals (VDWAALS), energia eletrostática (EEL), energia de solvatação polar (EGB) e apolar (ESURF), energia total em fase gasosa (GGAS), energia total de solvatação (GSOLV) e a energia total de ligação (TOTAL) para cada cenário.

ENERGIAS	VDWAALS	ENGULA	EGB	ESURF	GGAS	GSOLV	TOTAL
Sítio A (kcal/mol)							
mefloquina	-24.06	-16.82	25.38	-3.97	-40.87	21.41	-19.47
komaroviquinona	-36.94	-8.28	23.56	-4.37	-45.22	19.2	-26.03
brussonol	-26.99	-1.57	17.5	-3.58	-28.56	13.92	-14.64
Sítio B (kcal/mol)							
mefloquina	-23.59	-18.13	25.89	-4.02	-41.73	21.87	-19.85
komaroviquinona	-31.62	-8.1	22.63	-4.09	-39.72	18.54	-21.17
brussonol	-29.45	-3.4	18.8	-3.81	-32.85	14.99	-17.85
Sítio C (kcal/mol)							
mefloquina	-27.8	-9.52	24.25	-3.98	-37.32	20.28	-17.04
komaroviquinona	-36.11	-8.11	24.18	-4.29	-44.21	19.89	-24.32
brussonol	-26.81	-1.87	17.78	-3.54	-28.68	14.23	-14.44

Fonte: elaborada pelo autor.

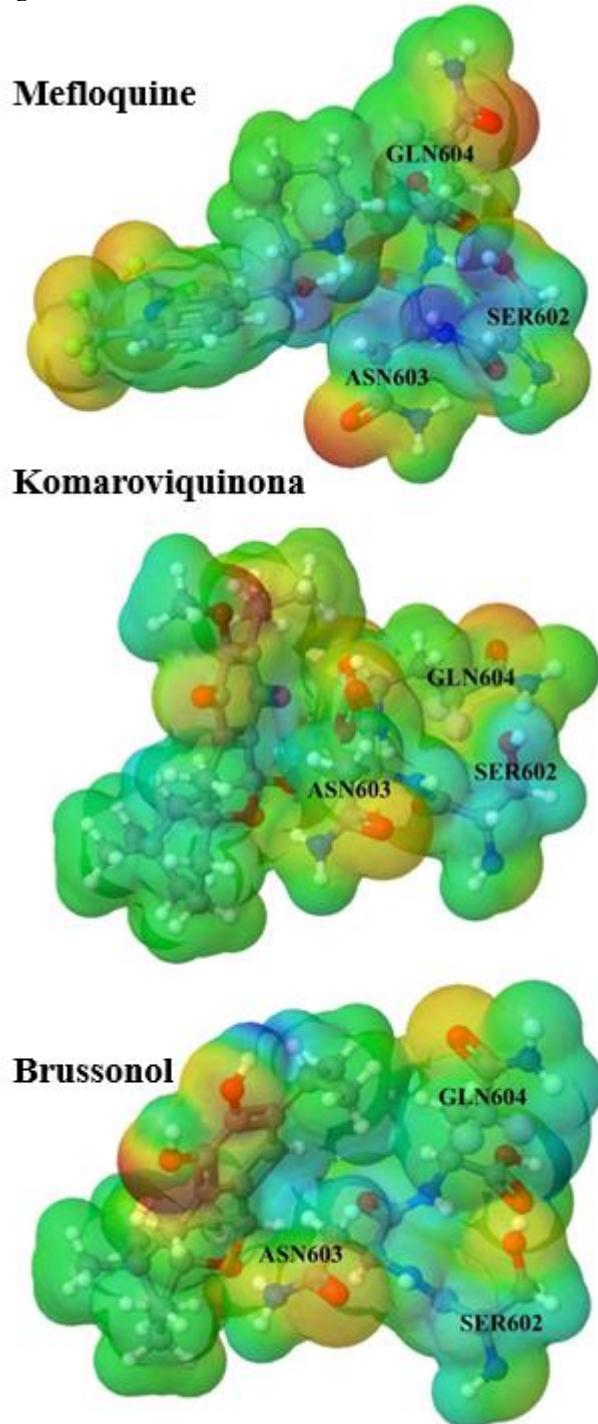
4.2.4. Análise Energética e Eletrostática das Interações Ligante-Proteína

Os resultados obtidos a partir das simulações de dinâmica molecular indicam que o resíduo ASN603 desempenha um papel central na formação de ligações de hidrogênio com os três ligantes estudados — brussonol, komarovquinona e mefloquina — em todos os três sítios de ligação (A, B e C). As energias de interação calculadas por DFT foram de -19,596 kcal/mol para o brussonol, -22,099 kcal/mol para a komarovquinona e -13,898 kcal/mol para a mefloquina. Esses valores sugerem que a komarovquinona e o brussonol apresentam maiores afinidades de ligação em comparação com a mefloquina, sendo a komarovquinona a que demonstrou a energia de interação mais negativa, evidenciando uma ligação mais forte com o resíduo ASN603.

A figura 10 apresenta o mapa de potencial eletrostático dos ligantes em interação com os resíduos SER602, ASN603 e GLN604. Esses mapas revelam interações significativas entre os ligantes e o resíduo ASN603, destacadas pelas regiões de densidade eletrônica ao redor desse resíduo. A mefloquina mostra uma distribuição de potencial eletrostático que sugere uma ligação moderada com o ASN603 e interações menos intensas com os resíduos adjacentes. Por outro lado, a komarovquinona apresenta uma densidade eletrônica mais intensa, indicando uma ligação robusta com o ASN603, além de interações adicionais com o GLN604. O brussonol, embora demonstre interação com o ASN603, exibe uma distribuição de densidade mais difusa, sugerindo uma ligação menos concentrada em comparação com a komarovquinona.

Essas diferenças nos mapas de potencial eletrostático refletem as distintas capacidades de ligação das moléculas analisadas. A komarovquinona, com sua ligação forte e interações adicionais, destaca-se como um potencial inibidor eficaz contra o SARS-CoV-2, particularmente na região de interação com o ASN603. O brussonol, embora menos intenso em suas interações, também apresenta potencial inibitório relevante, enquanto a mefloquina, como composto de referência, demonstra uma interação mais moderada, alinhando-se com seu perfil já estabelecido como medicamento antiviral. Essas observações reforçam o papel crítico do resíduo ASN603 como alvo para o desenvolvimento de inibidores da proteína spike do SARS-CoV-2.

Figura 10 - Mapa de potencial eletrostático das moléculas mefloquina, komarovquinona e brussonol interagindo com os resíduos SER602, ASN603 e GLN604 da proteína Spike SARS-CoV-2. A figura visualiza as interações eletrostáticas entre os ligantes e esses resíduos-chave, com ênfase particular na interação significativa observada entre as três moléculas e o ASN603.



Fonte: elaborada pelo autor.

4.3. Avaliação dos Produtos Naturais e Compostos de Referência: Estudo ADMET, Fingerprints e Reatividade Molecular com Base nas Funções de Fukui e Energias dos Orbitais HOMO e LUMO

Na análise ADMET os compostos barbatusol, brussonol e komaroviquinona demonstraram valores de solubilidade em água de -4,837, -4,595 e -4,27 log mol/L, respectivamente, juntamente com valores de permeabilidade ao Caco-2 de 1,616, 1,361 e 1,207 log Papp em 10^{-6} cm/s, respectivamente. Estes resultados indicam que as três substâncias possuem solubilidade e permeabilidade superiores ao nirmatrelvir, que exibiu uma solubilidade em água de -4,013 log mol/L e uma permeabilidade ao Caco-2 de 0,155 log Papp em 10^{-6} cm/s. Além disso, os produtos naturais apresentaram maior absorção intestinal em humanos do que o nirmatrelvir (90,906%, 90,561% e 95,817% contra 65,723%, respectivamente) (ver tabela 8).

A distribuição de barbatusol, brussonol e komaroviquinona também foi favorável, com o volume de distribuição (VDss) medindo 0,839, 0,737 e 0,23 log L/kg, respectivamente, enquanto o nirmatrelvir apresentou VDss de -1,023 log L/kg. Além disso, a fração não ligada dos produtos naturais foi menor em comparação com o nirmatrelvir (0,068, 0,12 e 0,272 versus 0,309, respectivamente).

Em termos de metabolismo, os compostos barbatusol e brussonol inibiram a enzima CYP2C19, enquanto komaroviquinona e nirmatrelvir não apresentaram inibição dessa enzima. O CYP2C19 é uma enzima do citocromo P450, envolvida no metabolismo de diversos fármacos e xenobióticos no fígado. Sua inibição pode alterar a taxa de metabolização de medicamentos, influenciando sua eficácia ou toxicidade, dependendo do composto. Além disso, a depuração total dos produtos naturais foi maior em relação ao nirmatrelvir (0,575, 0,359 e 0,51 log ml/min/kg versus 0,26 log ml/min/kg, respectivamente), sugerindo uma eliminação mais rápida dos compostos naturais, o que pode impactar seu perfil farmacocinético.

Barbatusol, brussonol e komaroviquinona não apresentaram toxicidade ou hepatotoxicidade por AMES, enquanto o nirmatrelvir demonstrou toxicidade em ambos os testes. Adicionalmente, os produtos naturais apresentaram menor toxicidade oral aguda em ratos (DL50) e menor toxicidade oral crônica em ratos (LOAEL) em comparação ao nirmatrelvir, sugerindo um perfil de segurança mais favorável para seu possível desenvolvimento como candidatos a fármacos antivirais.

Tabela 8 – Estudo ADMET das substâncias sob investigação. Os resultados incluem predições de propriedades relacionadas à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade das substâncias. Os dados foram obtidos do site <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcs/> e estão organizados de acordo com o modelo de predição, valor previsto e unidade de medida.

Propriedade	Nome do modelo	Barbatusol	Brussonol	Komaroviquinona	Nirmatrelvir	Unidade
Absorção	Solubilidade em água	-4.837	-4.595	-4.27	-4.013	Numérico (log mol/L)
Absorção	Permeabilidade ao Caco2	1.616	1.361	1.207	0.155	Numérico (log Papp em 10-6 cm/s)
Absorção	Absorção intestinal (humana)	90.906	90.561	95.817	65.723	Numérico (% absorvido)
Absorção	Permeabilidade da pele	-2.464	-2.823	-4.098	-3.178	Numérico (log Kp)
Absorção	Substrato de glicoproteína-P	Não	Não	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor da glicoproteína PI	Sim	Sim	Sim	Não	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor da glicoproteína P II	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Distribuição	VDss (humano)	0.839	0.737	0.23	-1.023	Numérico (log L/kg)
Distribuição	Fração não ligada (humana)	0.068	0.12	0.272	0.309	Numérico (Fu)
Distribuição	Permeabilidade BBB	0.081	-0.233	-0.265	-0.949	Numérico (log BB)
Distribuição	Permeabilidade do SNC	-2.176	-1.573	-2.861	-3.208	Numérico (log PS)
Metabolismo	Substrato do CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Substrato do CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP1A2	Sim	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	inibidor CYP2C19	Sim	Sim	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP2C9	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor do CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Excreção	Depuração Total	0.575	0.359	0.51	0.26	Numérico (log ml/min/kg)
Excreção	Substrato renal OCT2	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Toxicidade do AMES	Não	Não	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	Dose máxima tolerada (humana)	0.172	-0.194	-0.131	-0.772	Numérico (log mg/kg/dia)
Toxicidade	inibidor de hERG I	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	inibidor do hERG II	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)

Toxicidade	Toxicidade aguda oral em ratos (DL50)	2.322	2.365	2.076	2.908	Numérico (mol/kg)
Toxicidade	Toxicidade Crônica Oral em Rato (LOAEL)	1.769	1.324	1.851	0.842	Numérico (log mg/kg_bw/dia)
Toxicidade	Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Sim	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	sensibilização cutânea	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Toxicidade	<i>Toxicidade por T.Pyriformis</i>	2.164	1.392	0.449	0.316	Numérico (log ug/L)
Toxicidade	Toxicidade do minnow	-0.169	0.348	1.846	2.969	Numérico (log mM)

Fonte: elaborada pelo autor.

A análise de impressões digitais químicas, conduzida com os descritores MACCS-166 e ECFP-6, forneceu uma perspectiva sobre a comparabilidade estrutural de compostos naturais e sintéticos com potencial atividade antiviral contra a COVID-19.

A fingerprint MACCS-166, baseada na presença ou ausência de 166 fragmentos estruturais predefinidos, fornece uma análise binária que destaca características gerais da estrutura molecular. Por outro lado, o ECFP-6, ao explorar a conectividade atômica em profundidade, captura nuances mais específicas das interações moleculares, utilizando representações numéricas. Juntas, essas técnicas oferecem uma perspectiva abrangente sobre a relação estrutural entre os compostos analisados.

A tabela 9 fornece uma análise detalhada das similaridades estruturais entre compostos naturais e sintéticos por meio das impressões digitais químicas MACCS-166 e ECFP-6. Esses dados ajudam a compreender a relação estrutural entre os compostos estudados e os antivirais já aprovados pela FDA, como nirmatrelvir, remdesivir e ritonavir.

No índice MACCS-166, komaroviquinona e brussonol, com valores de 0,38, destacam-se mais que barbatusol (0,30) na similaridade estrutural com nirmatrelvir. Já no índice ECFP-6, komaroviquinona, com 0,17, se destaca frente aos demais compostos: barbatusol (0,15), brussonol (0,15), remdesivir (0,16) e ritonavir (0,16), na similaridade com nirmatrelvir. Essa observação evidencia o potencial estrutural de komaroviquinona para interagir de maneira semelhante a nirmatrelvir contra a COVID-19.

De forma geral, os dados indicam que, embora nirmatrelvir seja um medicamento aprovado com alta similaridade com outros antivirais estabelecidos, komaroviquinona destaca-se como um composto natural promissor, mostrando índices de similaridade que justificam sua investigação como potencial agente terapêutico contra o SARS-CoV-2. A análise holística

dessas informações reforça a importância de explorar compostos naturais como alternativas ou complementos aos tratamentos antivirais existentes.

Tabela 9 – Análise de Fingerprint usando MACCS-166 e ECFP-6

Análise Fingerprint	MACCS-166	ECFP-6
Nirmatrelvir e barbatusol	0.30	0.15
Nirmatrelvir e brussonol	0.38	0.15
Nirmatrelvir e komaroviquinona	0.38	0.17
Nirmatrelvir e remdesivir	0.46	0.16
Nirmatrelvir e ritonavir	0.49	0.16
remdesivir e barbatusol	0.30	0.14
remdesivir e brussonol	0.40	0.15
remdesivir e komaroviquinona	0.39	0.14
remdesivir e ritonavir	0.49	0.27
ritonavir e barbatusol	0.22	0.13
ritonavir e brussonol	0.29	0.12
ritonavir e komaroviquinona	0.31	0.14
ritonavir e remdesivir	0.49	0.27
Barbatusol e brussonol	0.76	0.51
Barbatusol e komaroviquinona	0.61	0.32
Brussonol e komaroviquinona	0.67	0.46

Fonte: elaborada pelo autor.

A análise de Fukui é uma ferramenta essencial para identificar centros eletrofílicos em moléculas, sendo amplamente utilizada no estudo de reações químicas e interações moleculares. Neste trabalho, a análise foi realizada com o software Chemcraft, que implementa a seguinte função para calcular os índices de Fukui: $f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r)$. Aqui, ρ representa a densidade eletrônica e N é o número total de elétrons na molécula. O termo $\rho_{N+1}(r)$ descreve a densidade eletrônica do ânion formado pela adição de um elétron à configuração eletrônica original $\rho_N(r)$. Valores elevados e positivos desta função indicam áreas da molécula que são mais suscetíveis a ataques de nucleófilos. Há uma ampla variedade de estudos que correlacionam estes índices de Fukui com reações observadas em química orgânica e até mesmo em processos metabólicos.

Na figura 11, a cor vermelha representa valores positivos de $f^+(r)$, destacando os centros eletrofílicos nas moléculas estudadas. No barbatusol, os átomos C16 e C13 apresentaram os maiores valores de $f^+(r)$, seguidos por C15 e C17. No brussonol, os carbonos C11, C16, C15 e C17 foram identificados como os principais centros eletrofílicos. Na komaroviquinona, os átomos de oxigênio O2 e O3 e os carbonos C10, C14, C15 e C17 se

destacaram. Por último, no nirmatrelvir, os centros eletrofílicos mais relevantes foram o carbono C13 e o oxigênio O3.

Além disso, foram analisadas as energias dos orbitais HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Esses orbitais fornecem informações cruciais sobre a reatividade e estabilidade dos compostos. As energias HOMO para barbatusol, brussonol, komaroviquinona e nirmatrelvir foram de -0,209920, -0,208200, -0,246330 e -0,251030 Hartree, respectivamente, enquanto as energias LUMO foram 0,001270, 0,002450, -0,120810 e -0,022100 Hartree.

A energia dos orbitais LUMO é uma medida da capacidade de um composto aceitar elétrons. Valores negativos para a energia LUMO podem ser atribuídos a vários fatores, como a presença de elétrons deslocalizados, grupos funcionais específicos, bem como a estrutura e o ambiente eletrônico do composto. No caso de komaroviquinona e nirmatrelvir, a presença de orbitais LUMO com energia negativa sugere que esses compostos têm maior capacidade de aceitar elétrons em comparação com barbatusol e brussonol, que possuem orbitais LUMO com energia positiva. O aumento da capacidade de aceitação de elétrons pode ser devido a um maior número de átomos eletronegativos e grupos funcionais que estabilizam elétrons no orbital LUMO (ver figura 12).

A relação entre as energias dos orbitais HOMO-LUMO e a interação dos compostos com a proteína Mpro pode ser ainda mais explorada considerando o papel crucial do resíduo Cys145 no sítio ativo da enzima. Esse resíduo contém um grupo tiol (-SH) altamente reativo, cuja nucleofilicidade pode ser modulada pela presença de compostos eletrófilos. Compostos com orbitais LUMO de menor energia, como komaroviquinona e nirmatrelvir, possuem maior tendência a aceitar elétrons, favorecendo interações covalentes ou estabilizadas com Cys145 por meio de mecanismos de transferência eletrônica. Essa característica sugere que esses ligantes podem formar interações mais eficazes com a Mpro, inibindo sua atividade catalítica. Dessa forma, a análise eletrônica dos ligantes reforça a relevância da komaroviquinona como um potencial inibidor, uma vez que seu perfil eletrônico favorece interações estratégicas com os resíduos críticos do sítio ativo da enzima.

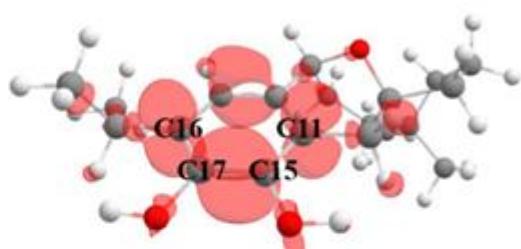
Todos esses resultados corroboram a hipótese de que komaroviquinona, devido à sua reatividade, pode ter um potencial significativo como inibidor da proteína Mpro. A análise combinada dos índices de Fukui e energias dos orbitais HOMO-LUMO fornece uma visão abrangente das propriedades eletrônicas dos ligantes, auxiliando na compreensão de suas interações com a proteína-alvo.

Figura 11 - Analise de fukui, imagem gerada usando software Chemcraft após aplicar a função $f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r)$. (a) barbatusol, (b) brussonol, (c) komaroviquinona e (d) nirmatrelvir.

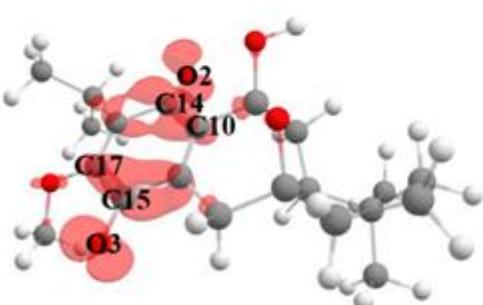
a. Barbatusol



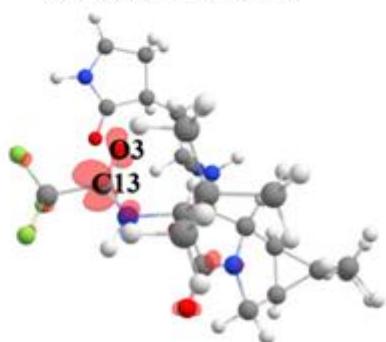
b. Brussonol



c. Komaroviquinona

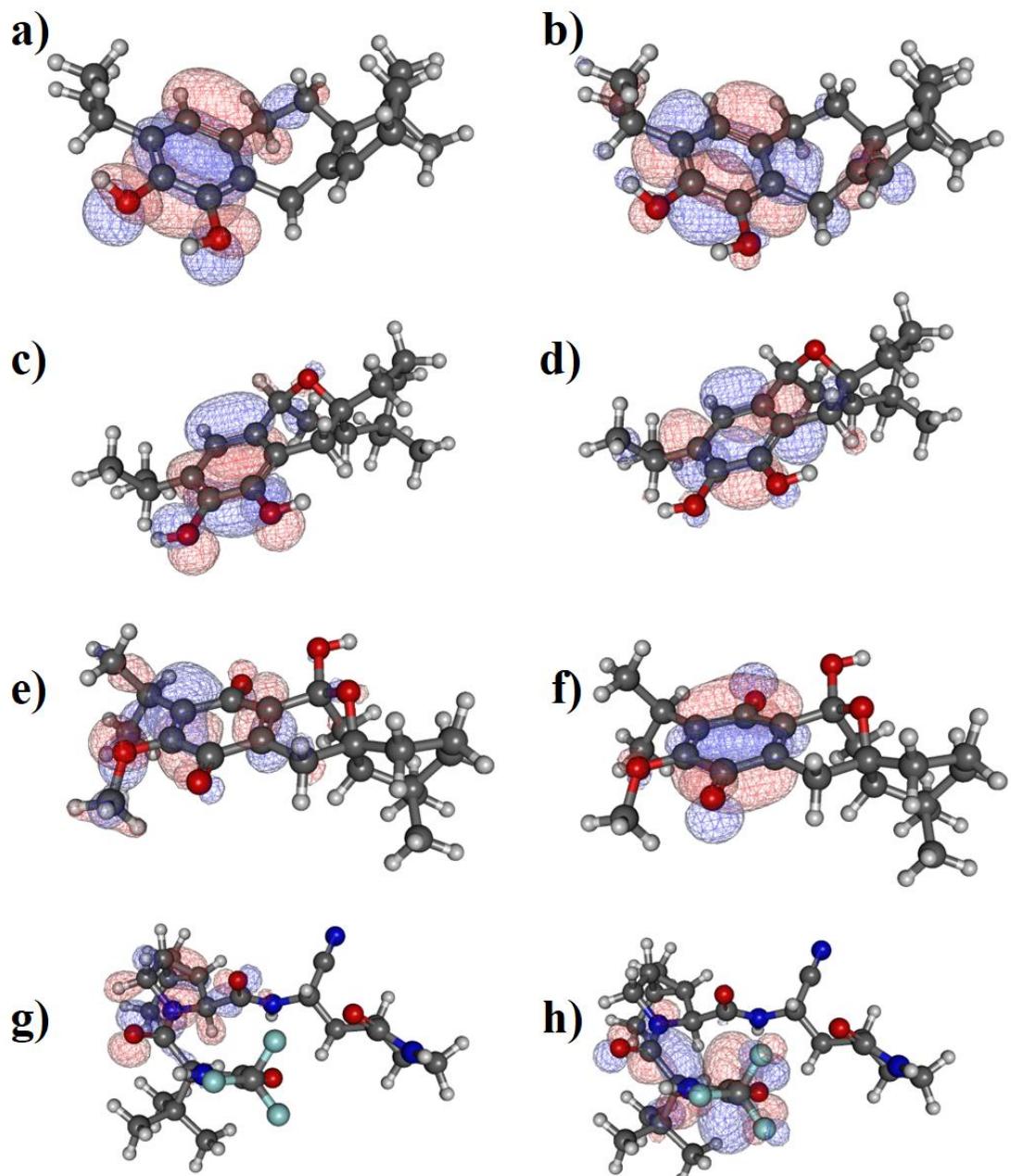


d. Nirmatrelvir



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 12 - Orbitais HOMO e LUMO dos compostos estudados. A figura apresenta os orbitais na seguinte ordem: (a) barbatusol HOMO, (b) barbatusol LUMO, (c) brussonol HOMO, (d) brussonol LUMO, (e) komaroviquinona HOMO, (f) komaroviquinona LUMO, (g) nirmatrelvir HOMO e (h) nirmatrelvir LUMO. Essas visualizações fornecem insights sobre as propriedades eletrônicas dos compostos e seu potencial reativo com a proteína Mpro do SARS-CoV-2.



Fonte: elaborada pelo autor.

5. CONCLUSÕES

A presente tese explorou de maneira abrangente as interações moleculares de compostos naturais promissores, como barbatusol, brussonol e komaroviquinona, com duas proteínas-alvo cruciais do SARS-CoV-2: a Mpro e a Spike, com foco na variante Omicron BA.2. Por meio de metodologias computacionais robustas, incluindo docking molecular, dinâmica molecular, abordagens QM/MM e análises de bioquímica quântica, foram obtidos insights detalhados sobre a estabilidade, afinidade de ligação e propriedades químicas desses compostos.

No estudo com a Mpro, os resultados destacaram a komaroviquinona como o composto com maior afinidade de ligação, frequentemente superando o medicamento de referência nirmatrelvir em termos de energia de ligação e estabilidade estrutural. A análise de energias de interação e as propriedades eletrônicas, como os índices de Fukui e os orbitais HOMO-LUMO, reforçaram o potencial deste composto como um inibidor reativo e eficiente. Por outro lado, barbatusol e brussonol também exibiram interações favoráveis e estabilidade notável, com características promissoras que justificam investigações adicionais.

No estudo com a proteína Spike, a komaroviquinona novamente se destacou, apresentando afinidades de ligação superiores à mefloquina e interações robustas com resíduos críticos, como o ASN603, conforme corroborado por análises de RMSD, mapas de potencial eletrostático e interações de curto alcance. A inclusão de NAGs e glicanos na estrutura trimérica da Spike foi um diferencial metodológico essencial, que proporcionou uma representação mais precisa das interações proteína-ligante e ressaltou a importância de considerar esses elementos estruturais em simulações computacionais.

Adicionalmente, as análises ADMET revelaram perfis farmacocinéticos e toxicológicos superiores para os compostos naturais em comparação ao nirmatrelvir, destacando a segurança desses candidatos no desenvolvimento de fármacos antivirais. A komaroviquinona, em particular, demonstrou uma combinação única de alta afinidade de ligação, estabilidade estrutural e perfil toxicológico favorável, posicionando-se como um forte candidato para estudos futuros.

Os resultados desta tese destacam o potencial de compostos naturais como alternativas terapêuticas eficazes contra o SARS-CoV-2, contribuindo para o desenvolvimento de antivirais inovadores. Embora os dados computacionais forneçam uma base sólida, a validação experimental é essencial. O desenvolvimento de um novo fármaco segue um rigoroso processo que envolve múltiplas etapas, desde estudos *in vitro*, para avaliar a atividade antiviral

e a seletividade dos compostos, até testes *in vivo*, que investigam sua eficácia e segurança em modelos animais. Caso os resultados sejam promissores em todas as etapas, os compostos seguem para ensaios clínicos, divididos em três fases: a Fase I, que avalia a segurança e a farmacocinética em um pequeno grupo de voluntários; a Fase II, onde a eficácia é testada em um grupo maior de pacientes, juntamente com estudos mais detalhados sobre segurança e dosagem; e a Fase III, que envolve um número ainda maior de participantes para confirmar a eficácia e monitorar possíveis efeitos adversos em larga escala. Somente após a aprovação por órgãos reguladores, como a FDA e a ANVISA, o fármaco pode ser disponibilizado para uso clínico. Dessa forma, este trabalho fornece uma base científica robusta para futuras investigações experimentais, possibilitando a continuidade dos estudos desses compostos em direção ao desenvolvimento de novas terapias antivirais.

REFERÊNCIAS

- ADJOUA, O.; LAGARDÈRE, L.; JOLLY, L.-H.; DUROCHER, A.; VERY, T.; DUPAYS, I.; WANG, Z.; JAFFRELLOT INIZAN, T.; CÉLERSE, F.; REN, P.; PONDER, J. W.; PIQUEMAL, J.-P. Tinker-HP: Accelerating Molecular Dynamics Simulations of Large Complex Systems with Advanced Point Dipole Polarizable Force Fields Using GPUs and Multi-GPU Systems. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 17, p. 2034–2053, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c01164>.
- AHMAD, A.; BURTOLOSO, A. C. B. Total Synthesis of (\pm)-brussonol and (\pm)-komaroviquinona via a Regioselective Cross-Electrophile Coupling of Aryl Bromides and Epoxides. **Org. Lett.**, v. 21, n. 15, p. 6079–6083, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b02221>.
- ALAMRI, M. A.; ALTHARAWI, A.; ALABBAS, A. B.; ALOSSAIMI, M. A.; ALQAHTANI, S. M. Structure-based virtual screening and molecular dynamics of phytochemicals derived from Saudi medicinal plants to identify potential COVID-19 therapeutics. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 7224–7234, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.08.004>.
- ALCOBA, D. R.; LAIN, L.; TORRE, A.; OÑA, O. B.; CHAMORRO, E. Fukui and dual-descriptor matrices within the framework of spin-polarized density functional theory. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 24, p. 9594–9604, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cp50736j>.
- ALI, A. S.; IBRAHIM, I. M.; BURZANGI, A. S.; GHONEIM, R. H.; ALJOHANI, H. S.; ALSAMHAN, H. A.; BARAKAT, J. Scoping insight on antiviral drugs against COVID-19. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 103385, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103385>.
- ALLOUCHE, A.-R. Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 174–182, 2011. <https://doi.org/10.1002/jcc.21600>.
- ALVARADO, Y. J.; OLIVAREZ, Y.; LOSSADA, C.; VERA-VILLALOBOS, J.; PAZ, J. L.; VERA, E.; LOROÑO, M.; VIVAS, A.; TORRES, F. J.; JEFFREYS, L. N.; HURTADO-LEÓN, M. L.; GONZÁLEZ-PAZ, L. Interaction of the new inhibitor paxlovid (PF-07321332) and ivermectin with the monomer of the main protease SARS-CoV-2: A volumetric study based on molecular dynamics, elastic networks, classical thermodynamics and SPT. **Computational Biology and Chemistry**, v. 99, n. 1, 107692, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.combiolchem.2022.107692>.
- AMIRAL, J.; SEGHATCHIAN, J. Autoimmune complications of COVID-19 and potential consequences for long-lasting disease syndromes. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 62, n. 1, 103625, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2022.103625>.
- ARYA, R.; TRIPATHI, P.; NAYAK, K.; GANESH, J.; BIHANI, S. C.; GHOSH, B.; PRASHAR, V.; KUMAR, M. Insights into the evolution of mutations in SARS-CoV-2 non-spike proteins. **Microbial Pathogenesis**, v. 185, 106460, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106460>.

ASSAF, E. I.; LIU, X.; LIN, P.; ERKENS, S. PDB2DAT: Automating LAMMPS data file generation from PDB molecular systems using Python, Rdkit, and Pysimm. **Software Impacts**, v. 20, 100656, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.simpa.2024.100656>.

BENTO, A. P.; HERSEY, A.; FÉLIX, E.; LANDRUM, G.; GAULTON, A.; ATKINSON, F.; BELLIS, L. J.; DE VEIJ, M.; LEACH, A. R. An open source chemical structure curation pipeline using RDKit. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 51, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00456-1>.

BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.

BIENERT, S.; WATERHOUSE, A.; DE BEER, T. A. P.; TAURIELLO, G.; STUDER, G.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D313–D319, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>.

BOLNYKH, V.; OLSEN, J. M. H.; MELONI, S.; BIRCHER, M. P.; IPPOLITI, E.; CARLONI, P.; ROTHLISBERGER, U. Extreme scalability of DFT-based QM/MM MD simulations using MiMiC. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 10, p. 5601–5613, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00424>.

BOSTANGHADIRI, N.; ZIAEE, P.; MOFRAD, M. G.; YOUSEFZADEH, P.; HASHEMI, A.; DARBAN-SAROKHALIL, D. COVID-19: An overview of SARS-CoV-2 variants—The current vaccines and drug development. **BioMed Research International**, v. 2023, n. 1. 1879554, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/1879554>.

BURKI, T. The future of Paxlovid for COVID-19. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 10, n. 7, p. e68, 2022. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(22\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(22)00192-8).

BUXERAUD, J.; FAURE, S.; FOUGERE, E. Le nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid®), un traitement contre la Covid-19. **Actualités Pharmaceutiques**, v. 61, n. 617. p. 10-12, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2022.05.002>.

CAO, Y.; CHOI, Y. K.; FRANK, M.; WOO, H.; PARK, S.-J.; YEOM, M. S.; SEOK, C.; IM, W. Dynamic interactions of fully glycosylated SARS-CoV-2 spike protein with various antibodies. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6559–6569, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00552>.

CASE, D. A.; AKTULGA, H. M.; BELFON, K.; CERUTTI, D. S.; CISNEROS, G. A.; CRUZEIRO, V. W. D.; FOROUZESH, N.; GIESE, T. J.; GÖTZ, A. W.; GOHLKE, H. *et al.* AmberTools: A suite of tools for molecular simulations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 63, n. 20, p. 6183–6191, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01153>.

CHANDRAMOHAN, U. M.; JOSEPH, D. Hirshfeld surface, Fukui function, molecular docking, and molecular dynamics investigation on human immunodeficiency virus-1 (HIV) organism with 2,6-dibromo-4-chloroaniline. **Results in Chemistry**, v. 11, 101815, p. 1–12, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2024.101815>.

CHAUDHURI, R.; CARRILLO, O.; LAUGHTON, C. A.; OROZCO, M. Application of drug-perturbed essential dynamics/molecular dynamics (ED/MD) to virtual screening and rational drug design. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 7, p. 2204–2214, 2012. <https://doi.org/10.1021/ct300223c>.

CHEN, C.; LIANG, H.; DENG, Y.; YANG, X.; LI, X.; HOU, C. Analysis and identification of bioactive compounds of cannabinoids *in silico* for inhibition of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1729, 2022. <https://doi.org/10.3390/biom12121729>.

DAI, W.; ZHANG, B.; JIANG, X.-M.; SU, H.; LI, J.; ZHAO, Y.; XIE, X.; JIN, Z.; PENG, J.; LIU, F.; LI, C.; BAI, F.; WANG, H.; CHENG, X.; CEN, X.; HU, S.; YANG, X.; WANG, J.; LIU, X.; XIAO, G.; JIANG, H.; RAO, Z.; ZHANG, L.-K.; XU, Y.; YANG, H.; LIU, H. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 368, n. 6497, p. 1331–1335, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb4489>.

DAWOOD, A. A. The efficacy of Paxlovid against COVID-19 is the result of the tight molecular docking between Mpro and antiviral drugs (nirmatrelvir and ritonavir). **Advances in Medical Sciences**, v. 68, n. 1, p. 1–9, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2022.10.001>.

DE, S. K. Recent discovery of peptidomimetics for the treatment of coronavirus (COVID-19), human coronavirus, and enteroviruses. **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 10, p. 1289–1295, 2024. <https://doi.org/10.2174/0929867330666230504150758>.

DE, S. K. Discovery of novel cysteine protease inhibitors for the treatment of coronavirus (COVID-19). **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 9, p. 1165–1169, 2024. <https://doi.org/10.2174/0929867330666230519163305>.

DE WIT, E.; VAN DOREMALEN, N.; FALZARANO, D.; MUNSTER, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 523–534, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>.

DUAN, Y.; WU, C.; CHOWDHURY, S.; LEE, M. C.; XIONG, G.; ZHANG, W.; YANG, R.; CIEPLAK, P.; LUO, R.; LEE, T.; CALDWELL, J.; WANG, J.; KOLLMAN, P. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 16, p. 1999–2012, 2003. <https://doi.org/10.1002/jcc.10349>.

DUBE, T.; GHOSH, A.; MISHRA, J.; KOMPELLA, U. B.; PANDA, J. J. Repurposed drugs, molecular vaccines, immune-modulators, and nanotherapeutics to treat and prevent COVID-19 associated with SARS-CoV-2, a deadly nanovector. **Advanced Therapeutics**, v. 4, n. 2, 2000172, 2021. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000172>.

DURANT, J. L.; LELAND, B. A.; HENRY, D. R.; NOURSE, J. G. Reoptimization of MDL keys for use in drug discovery. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 6, p. 1273–1280, 2002. <https://doi.org/10.1021/ci010132r>.

GAO, K.; WANG, R.; CHEN, J.; HUANG, F.; TEPE, J. J.; WEI, G.-W. Perspectives on SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 23, p. 16922–16955, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00409>.

GAO, K.; WANG, R.; CHEN, J.; WEI, G.-W. Methodology-centered review of molecular modeling, simulation, and prediction of SARS-CoV-2. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 13, p. 11287–11368, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00965>.

GAPSYS, V.; PÉREZ-BENITO, L.; ALDEGHI, M.; SEELIGER, D.; VAN VLIJMEN, H.; TRESADERN, G.; DE GROOT, B. L. Large-scale relative protein-ligand binding affinities using non-equilibrium alchemy. **Chemical Science**, v. 11, n. 4, p. 1140–1153, 2020. <https://doi.org/10.1039/c9sc03754c>.

GAYNOR, K. U.; VAYSBURD, M.; HARMAN, M. A. J.; ALBECKA, A.; JEFFREY, P.; BESWICK, P.; PAPA, G.; CHEN, L.; MALLERY, D.; MC GUINNESS, B.; VAN RIETSCHOTEN, K.; et al. Multivalent bicyclic peptides are an effective antiviral modality that can potently inhibit SARS-CoV-2. **Nature Communications**, v. 14, n. 3583, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39158-1>.

GILSON, M. K.; LIU, T.; BAITALUK, M.; NICOLA, G.; HWANG, L.; CHONG, J. BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1045–D1053, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1072>.

GIUDETTI, G.; POLYAKOV, I.; GRIGORENKO, B. L.; FARAJI, S.; NEMUKHIN, A. V.; KRYLOV, A. I. How reproducible are QM/MM simulations? Lessons from computational studies of the covalent inhibition of the SARS-CoV-2 main protease by Carmofur. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 18, n. 8, p. 5056–5067, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c00286>.

GOVINDASAMY, H.; MAGUDEESWARAN, S.; KANDASAMY, S.; POOMANI, K. Binding mechanism of naringenin with monoamine oxidase-B enzyme: QM/MM and molecular dynamics perspective. **Heliyon**, v. 7, n. 4, e06684, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06684>.

GOWTHAMAN, R.; GUEST, J. D.; YIN, R.; ADOLF-BRYFOGLE, J.; SCHIEF, W. R.; PIERCE, B. G. CoV3D: A database of high-resolution coronavirus protein structures. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D282–D287, 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa731>.

GRANT, O. C.; MONTGOMERY, D.; ITO, K.; WOODS, R. J. Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. **Scientific Reports**, v. 10, n. 14991, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71748-7>.

GRIMME, S.; ANTONY, J.; EHRLICH, S.; KRIEG, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. **Journal of Chemical Physics**, v. 132, n. 15, p. 154104, 2010. <https://doi.org/10.1063/1.3382344>.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 17, 2012. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

- HARRACH, M. F.; DROSSEL, B. Structure and dynamics of TIP3P, TIP4P, and TIP5P water near smooth and atomistic walls of different hydroaffinity. **Journal of Chemical Physics**, v. 140, n. 17, p. 174501, 2014. <https://doi.org/10.1063/1.4872239>.
- HILLEN, H. S.; KOKIC, G.; FARNUNG, L.; DIENEMANN, C.; TEGUNOV, D.; CRAMER, P. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. **Nature**, v. 584, n. 6, p. 154–160, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>.
- HOLLERINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular dynamics simulation for all. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>.
- HUANG, Y.; YANG, C.; XU, X.-F.; XU, W.; LIU, S.-W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, p. 1141–1149, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>.
- HUFF, S.; REDDY, I. K.; TIWARI, S. K.; HUANTE, M. B.; CLARK, A. E.; WANG, S.; BRAY, W.; SMITH, D.; CARLIN, A. F.; ENDSLEY, M.; RANA, T. M. Discovery and mechanism of SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 2866–2879, 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00566>.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- JI, B.; WU, Y.; THOMAS, E. N.; EDWARDS, J. N.; HE, X.; WANG, J. Predicting anti-SARS-CoV-2 activities of chemical compounds using machine learning models. **Artificial Intelligence Chemistry**, v. 1, 100029, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.aichem.2023.100029>.
- JIANG, Z.-Y.; YU, Y.-J.; HUANG, C.-G.; HUANG, X.-Z.; HU, Q.-F.; YANG, G.-Y.; WANG, H.-B.; ZHANG, X.-Y.; LI, G.-P. Ictexane diterpenoids from Perovskia atriplicifolia. **Planta Med.**, v. 81, n. 03, p. 241–246, 2016. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1396151>.
- JIN, Z.; DU, X.; XU, Y.; DENG, Y.; LIU, M.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; LI, X.; ZHANG, L.; PENG, C.; DUAN, Y.; YU, J.; WANG, L.; YANG, K.; LIU, F.; JIANG, R.; YANG, X.; LIU, X.; BAI, F.; LIU, H.; LIU, X.; GUDDAT, L. W.; XU, W.; XIAO, G.; QIN, C.; SHI, Z.; JIANG, H.; RAO, Z.; YANG, H. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, p. 289–293, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
- JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS potential functions for proteins: energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657–1666, 1988. <https://doi.org/10.1021/ja00214a001>.
- JURRUS, E.; ENGEL, D.; STAR, K.; MONSON, K.; BRANDI, J.; FELBERG, L. E.; BROOKES, D. H.; WILSON, L.; CHEN, J.; LILES, K.; CHUN, M.; LI, P.; GOHARA, D. W.; DOLINSKY, T.; KONECNY, R.; KOES, D. R.; NIELSEN, J. E.; HEAD-GORDON, T.; GENG, W.; KRASNY, R.; WEI, G.-W.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 112–128, 2018. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>.

KANG, J.; LE, T. Q.; OH, C. H. Recent advances in abietane/icetexane synthesis. *Tetrahedron Letters*, v. 108, 154133, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2022.154133>.

KIM, S.; CHEN, J.; CHENG, T.; GINDULYTE, A.; HE, J.; HE, S.; LI, Q.; SHOEMAKER, B. A.; THIESSEN, P. A.; YU, B.; ZASLAVSKY, L.; ZHANG, J.; BOLTON, E. E. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D1373–D1380, 2023. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>.

KONC, J.; MILLER, B. T.; STULAR, T.; LESNIK, S.; WOODCOCK, H. L.; BROOKS, B. R.; JANEZIC, D. ProBiS-CHARMMing: Web interface for prediction and optimization of ligands in protein binding sites. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 55, n. 11, p. 2308–2314, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00534>.

LAINO, T.; MOHAMED, F.; LAIO, A.; PARRINELLO, M. An efficient real-space multigrid QM/MM electrostatic coupling. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 1, n. 6, p. 1176–1184, 2005. <https://doi.org/10.1021/ct050123f>.

LEE, M. R.; SUN, Y. Improving docking accuracy through molecular mechanics generalized Born optimization and scoring. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 3, n. 3, p. 1106–1119, 2007. <https://doi.org/10.1021/ct6003406>.

LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. Assessing the stability of Alzheimer's amyloid protofibrils using molecular dynamics. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, n. 4, p. 1652–1660, 2010. <https://doi.org/10.1021/jp9110794>.

LEMKUL, J. A.; BEVAN, D. R. The role of molecular simulations in the development of inhibitors of amyloid β -peptide aggregation for the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 3, n. 11, p. 845–856, 2012. <https://doi.org/10.1021/cn300091a>.

LINDORFF-LARSEN, K.; PIANA, S.; PALMO, K.; MARAGAKIS, P.; KLEPEIS, J. L.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, v. 78, n. 8, p. 1950–1958, 2010. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>.

LIU, J.-Z.; LYU, H.-C.; FU, Y.-J.; CUI, Q. Amomum tsao-ko essential oil, a novel anti-COVID-19 Omicron spike protein natural product: A computational study. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 15, n. 7, 103916, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103916>.

MAHESWARI, C. U. QM, Fukui function, molecular docking, molecular dynamics investigation on human estrogen receptor (HER) with Clioquinol. *Chemical Physics Impact*, v. 8, p. 100570, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2024.100570>.

MANNAR, D.; SAVILLE, J. W.; SUN, Z.; ZHU, X.; MARTI, M. M.; SRIVASTAVA, S. S.; BEREZUK, A. M.; ZHOU, S.; TUTTLE, K. S.; SOBOLEWSKI, M. D.; et al. SARS-CoV-2 variants of concern: spike protein mutational analysis and epitope for broad neutralization. *Nature Communications*, v. 13, 4696, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32262-8>.

MARK, P.; NILSSON, L. Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 43, p. 9954–9960, 2001. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.

MARTENS-LOBENHOFFER, J.; BÖGER, C. R.; KIELSTEIN, J.; BODE-BÖGER, S. M. Simultaneous quantification of nirmatrelvir and ritonavir by LC-MS/MS in patients treated for COVID-19. **Journal of Chromatography B**, v. 1212, 123510, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123510>.

MARTYNA, G. J.; HUGHES, A.; TUCKERMAN, M. E. Molecular dynamics algorithms for path integrals at constant pressure. **Journal of Chemical Physics**, v. 110, p. 3275–3290, 1999. <https://doi.org/10.1063/1.478193>.

MILLER, B. R.; MCGEE, T. D.; SWAILS, J. M.; HOMEYER, N.; GOHLKE, H.; ROITBERG, A. E. MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 2012. <https://doi.org/10.1021/ct300418h>.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

MURATOV, E. N.; AMARO, R.; ANDRADE, C. H.; BROWN, N.; EKINS, S.; FOURCHES, D.; ISAYEV, O.; KOZAKOV, D.; MEDINA-FRANCO, J. L.; MERZ, K. M.; et al. A critical overview of computational approaches employed for COVID-19 drug discovery. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 16, p. 9121–9151, 2021. <https://doi.org/10.1039/d0cs01065k>.

NAEINI, A. A.; ZIEGELMEIER, A. A.; CHAIN, W. J. Recent developments with icetexane natural products. **Chemistry & Biodiversity**, v. 19, n. 11, e202200793, 2022. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200793>.

NEESE, F.; WENNMOHS, F.; BECKER, U.; RIPLINGER, C. The ORCA quantum chemistry program package. **Journal of Chemical Physics**, v. 152, 224108, 2020. <https://doi.org/10.1063/5.0004608>.

NEESE, F. Software update: The ORCA program system, version 4.0. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, e1327, 2017. <https://doi.org/10.1002/wcms.1327>.

NEESE, F. The ORCA program system. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 73–78, 2012. <https://doi.org/10.1002/wcms.81>.

- NIETO, M.; GARCÍA, E. E.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E. Icetexane and abietane diterpenoids from *Salvia gilliessi*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 911-915, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00480-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00480-X).
- NURCAHYANINGTYAS, H. R.; IRENE, A.; WIBOWO, J. T.; PUTRA, M. Y.; YANUAR, A. Identification of potential Indonesian marine invertebrate bioactive compounds as TMPRSS2 and SARS-CoV-2 Omicron spike protein inhibitors through computational screening. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 9, 104984, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104984>.
- OH, C. H.; PIAO, L.; JUNG, J.; KIM, J. A formal synthesis of komarovquinona: Use of a Pt-catalyzed hydrative cyclization reaction. **Asian Journal of Organic Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 1237–1241, 2016. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201600340>.
- OKAYAMA, M.; FUJIMORI, K.; SATO, M.; SAMATA, K.; KURITA, K.; SUGIYAMA, H.; SUTO, Y.; IWASAKI, G.; YAMADA, T.; KIUCHI, F.; ICHIKAWA, D.; MATSUHITA, M.; HIRAO, M.; KUNIEDA, H.; YAMAZAKI, K.; HATTORI, Y. GTN057, a komarovquinona derivative, induced myeloma cells' death in vivo and inhibited c-MET tyrosine kinase. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 8, p. 9749–9759, 2023. <https://doi.org/10.1002/cam4.5691>.
- OLSEN, J. M. H.; BOLNYKH, V.; MELONI, S.; IPPOLITI, E.; BIRCHER, M. P.; CARLONI, P.; ROTHLISBERGER, U. MiMiC: A novel framework for multiscale modeling in computational chemistry. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 15, n. 6, p. 3810–3823, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00093>.
- OWEN, D. R.; ALLERTON, C. M. N.; ANDERSON, A. S.; ASCHENBRENNER, L.; Avery, M.; BERRITT, S.; BORAS, B.; CARDIN, R. D.; CARLO, A.; COFFMAN, K. J.; et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, v. 374, n. 6575, p. 1586–1593, 2021. <https://doi.org/10.1126/science.abl4784>.
- PARK, J. E.; JUNG, S.; KIM, A.; PARK, J. E. MERS transmission and risk factors: A systematic review. **BMC Public Health**, v. 18, 574, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5484-8>.
- PARSONS, R. J.; ACHARYA, P. Evolution of the SARS-CoV-2 Omicron spike. **Cell Reports**, v. 42, n. 12, 113444, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113444>.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.
- POLI, A. N. R.; TIETJEN, I.; NANDWANA, N. K.; CASSEL, J.; MESSICK, T. E.; REGISTER, E. T.; KEENEY, F.; RAJAIAH, R.; VERMA, A. K.; PANDEY, K.; ACHARYA, A.; BYRAREDDY, S. N.; MONTANER, L. J.; SALVINO, J. M. Design of novel and highly selective SARS-CoV-2 main protease inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 68, n. 10, p. e00562-24, 2024. <https://doi.org/10.1128/aac.00562-24>.
- PRONK, S.; PÁLL, S.; SCHULZ, R.; LARSSON, P.; BJELKMAR, P.; APOSTOLOV, R.; SHIRTS, M. R.; SMITH, J. C.; KASSON, P. M.; VAN DER SPOEL, D.; HESS, B.;

LINDAHL, E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open-source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>.

RAMARAJAN, D.; BARATHI, D.; SUDHA, S. Structural, spectroscopic (FTIR, FT-Raman and UV–Vis) investigations, Fukui function analysis and thermodynamic properties of diethyl 3,3'-(ethane-1,2-diylbis(azanediyl))(2Z,2'Z)-bis(but-2-enoate). **Journal of Molecular Structure**, v. 1316, 138977, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.138977>.

ROGERS, D.; HAHN, M. Extended-connectivity fingerprints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 5, p. 742–754, 2010. <https://doi.org/10.1021/ci100050t>.

ROSS, G. A.; MORRIS, G. M.; BIGGIN, P. C. One size does not fit all: The limits of structure-based models in drug discovery. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 9, n. 9, p. 4266–4274, 2013. <https://doi.org/10.1021/ct4004228>.

RUT, W.; LV, Z.; ZMUDZINSKI, M.; PATCHETT, S.; NAYAK, D.; SNIPAS, S. J.; EL OUALID, F.; HUANG, T. T.; BEKES, M.; DRAG, M.; OLSEN, S. K. Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti–COVID-19 drug design. **Science Advances**, v. 6, n. 42, eabd4596, 2020. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd4596>.

SALES, P. T. F.; SOUZA, K. M.; BEZERRA, A. G.; OJALA, S. A.; OLIVEIRA, S. B.; BARA, M. T. F. Quantum chemical calculations and their uses. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, e45910817567, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17567>.

SANTANA, C. A.; IZIDORO, S. C.; DE MELO-MINARDI, R. C.; TYZACK, J. D.; RIBEIRO, A. J. M.; PIRES, D. E. V.; THORNTON, J. M.; SILVEIRA, S. A. GRaSP-web: A machine learning strategy to predict binding sites based on residue neighborhood graphs. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. W1, W392–W397, 2022. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac323>.

SANTANA, C. A.; SILVEIRA, S. A.; IZIDORO, S. C.; DE MELO-MINARDI, R. C.; MORAES, J. P. A.; RIBEIRO, A. J. M.; TYZACK, J. D.; BORKAKOTI, N.; THORNTON, J. M. GRaSP: A graph-based residue neighborhood strategy to predict binding sites. **Bioinformatics**, v. 36, p. i726–i734, 2020. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa805>.

SANTOS, S. J. M.; VALENTINI, A. *In silico* investigation of komarovquinona as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM approaches. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 126, 108662, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2023.108662>.

SARAVANAN, K.; MAGUDEESWARAN, S.; GOVINDASAMY, H.; LAKSHMANAN, M.; POOMANI, K. Investigation of intermolecular interactions and stability of Verubecestat in the active site of BACE1: Development of first model from QM/MM based charge density and MD analysis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 9, 2019. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1479661>.

SHARMA, P.; AWASTHI, P. Synthesis, characterization, *in vivo*, molecular docking, ADMET, and HOMO-LUMO study of juvenile hormone analogues having sulfonamide

feature as insect growth regulators. **Journal of Molecular Structure**, v. 1231, 129945, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.129945>.

SHIMAMURA, K.; AKIYAMA, T.; YOKOYAMA, K.; TAKENOYA, M.; ITO, S.; SASAKI, Y.; YAJIMA, S. Structural basis of substrate recognition by the substrate binding protein (SBP) of a hydrazide transporter, obtained from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 525, n. 3, p. 720–725, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.146>.

SIZIANI, D.; ABDI, Y.; BEZZINA, B.; ATTOU, Z.; BENSOUILAH, N.; BOUTEMEUR, B. A combined theoretical and experimental investigation on the solvatochromism of fused chromene-furanopyran: Determination of dipole moments, DFT/TD-DFT, chemical reactivity and Fukui function. **Journal of Molecular Structure**, v. 1319, 139473, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.139473>.

SPARTALIS, M.; ZWEIKER, D.; SPARTALIS, E.; ILIOPOULOS, D. C.; SIASOS, G. Long COVID-19 syndrome and sudden cardiac death: The phantom menace. **Current Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 2-6, 2024. <https://doi.org/10.2174/0929867330666230515145041>.

STADLER, K.; MASIGNANI, V.; EICKMANN, M.; BECKER, S.; ABRIGNANI, S.; KLENK, H. D.; RAPPOLI, R. SARS—beginning to understand a new virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, p. 209–218, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrmicro775>.

STARR, T. N.; CZUDNOCHOWSKI, N.; LIU, Z.; ZATTA, F.; PARK, Y. J.; ADDITIA, A.; BLOOM, J. D. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape. **Nature**, v. 597, p. 97–102, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03807-6>.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15—ligand discovery for everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 11, p. 2324–2337, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>.

STUDER, G.; REMPFER, C.; WATERHOUSE, A. M.; GUMIENNY, R.; HAAS, J.; SCHWEDE, T. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1765–1771, 2020. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>.

SU, H.; YAO, S.; ZHAO, W.; LI, M.; LIU, J.; SHANG, W.; XIE, H.; KE, C.; HU, H.; GAO, M.; YU, K.; LIU, H.; SHEN, J.; TANG, W.; ZHANG, L.; XIAO, G.; NI, L.; WANG, D.; ZUO, J.; JIANG, H.; BAI, F.; WU, Y.; YE, Y.; XU, Y. Anti-SARS-CoV-2 activities in vitro of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, p. 1167–1177, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0483-6>.

SUBISSI, L.; VON GOTTBURG, A.; THUKRAL, L.; WORP, N.; OUDE MUNNINK, B. B.; AGRAWAL, A. An early warning system for emerging SARS-CoV-2 variants. **Nature Medicine**, v. 28, p. 1110–1115, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01836-w>.

SUN, S.; KARKI, C.; AGUILERA, J.; HERNANDEZ, A. E. L.; SUN, J.; LI, L. Computational study on the function of palmitoylation on the envelope protein in SARS-CoV-2. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6483–6490, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00359>.

SUTO, Y.; SATO, M.; FUJIMORI, K.; KITABATAKE, S.; OKAYAMA, M.; ICHIKAWA, D.; MATSUHITA, M.; YAMAGIWA, N.; IWASAKI, G.; KIUCHI, F.; HATTORI, Y. Synthesis and biological evaluation of the natural product komaroviquinona and related compounds aiming at a potential therapeutic lead compound for high-risk multiple myeloma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 19, p. 4558–4563, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.054>.

SUTO, Y.; KANEKO, K.; YAMAGIWA, N.; IWASAKI, G. A short and efficient asymmetric synthesis of komaroviquinona. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 48, p. 6329–6330, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.09.110>.

TAN, Y. S.; VERMA, C. S. Straightforward incorporation of multiple ligand types into molecular dynamics simulations for efficient binding site detection and characterization. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 16, n. 10, p. 6633–6644, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.0c00405>.

TASSAKKA, A. C. M. A. R.; SUMULE, O.; MASSI, M. N.; SULFAHRI; MANGGAU, M.; ISKANDAR, I. W.; ALAM, J. F.; PERMANA, A. D.; LIAO, L. M. Potential bioactive compounds as SARS-CoV-2 inhibitors from extracts of the marine red alga *Halymenia durvillei* (Rhodophyta) – A computational study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 11, 103393, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103393>.

TEKIN, E. D. Investigation of the effects of N-Acetylglucosamine on the stability of the spike protein in SARS-CoV-2 by molecular dynamics simulations. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1222, 114049, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2023.114049>.

TJÖRNHAMMAR, R. O. Clustering method in QMMM modeling of the HLADH binding site. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 3, 39A, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.12.224>.

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, p. 455–461, 2010. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

UCHIYAMA, N.; KABUTUTU, Z.; KUBATA, B. K.; KIUCHI, F.; ITO, M.; SHIMADA, J. N.; AOKI, T.; OHKUBO, K.; FUKUZUMI, S.; MARTIN, S. K.; HONDA, G.; URADE, Y. Antichagasic activity of komaroviquinona is due to generation of reactive oxygen species catalyzed by Trypanosoma cruzi old yellow enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5123–5126, 2005. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5123-5126.2005>.

UCHIYAMA, N.; KIUCHI, F.; ITO, M.; HONDA, G.; TAKEDA, Y.; KHODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O. A. New icetexane and 20-norabietane diterpenes with trypanocidal activity from *Dracocephalum komarovii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 1, p. 128–131, 2003. <https://doi.org/10.1021/np020308z>.

VALDÉS-TRESANCO, M. S.; VALDÉS-TRESANCO, M. E.; VALIENTE, P. A.; MORENO FRIAS, E. gmx_MMPSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy

Calculations with GROMACS. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 10, p. 6281–6291, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>.

VICATOS, S.; ROCA, M.; WARSHEL, A. Effective approach for calculations of absolute stability of proteins using focused dielectric constants. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 77, n. 3, p. 670–684, 2009. <https://doi.org/10.1002/prot.22481>.

VIJAYAKUMAR, M.; JANANI, B.; KANNAPPAN, P.; RENGENATHAN, S.; AL-GHAMDI, S.; ALSAIDAN, M.; ABDELAZIZ, M. A.; MOHIDEEN, A. P.; SHAHID, M.; RAMESH, T. *In silico* identification of potential inhibitors against main protease of SARS-CoV-2 6LU7 from Andrographis panniculata via molecular docking, binding energy calculations and molecular dynamics simulation studies. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 18–29, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.060>.

VIVEK-ANANTH, R. P.; RANA, A.; RAJAN, N.; BISWAL, H. S.; SAMAL, A. *In Silico* Identification of Potential Natural Product Inhibitors of Human Proteases Key to SARS-CoV-2 Infection. **Molecules**, v. 25, n. 17, 3822, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25173822>.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995. <https://doi.org/10.1093/protein/8.2.127>.

WANG, Q.; FAN, T.; JIA, R.; ZHANG, N.; ZHAO, L.; ZHONG, R.; SUN, G. First report on the QSAR modelling and multistep virtual screening of the inhibitors of nonstructural protein Nsp14 of SARS-CoV-2: Reducing unnecessary chemical synthesis and experimental tests. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 17, n. 3, 105614, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2024.105614>.

WANG, Y.; GAO, J. Projected Hybrid Orbitals: A General QM/MM Method. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 3, p. 1213–1224, 2015. <https://doi.org/10.1021/jp507983u>.

WARDANA, A. P.; AMINAH, N. S.; ROSYDA, M.; ABDJAN, M. I.; KRISTANTI, A. N.; TUN, K. N. W.; CHOUDHARY, M. I.; TAKAYA, Y. Potential of diterpene compounds as antivirals, a review. **Heliyon**, v. 7, n. 8, e07777, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07777>.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMIENNY, R.; HEER, F. T.; DE BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, W296–W303, 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.

XU, Y.; AL-MUALM, M.; TEREFÉ, E. M.; SHAMSUTDINOVA, M. I.; OPULENCIA, M. J. C.; ALSAIKHAN, F.; JALIL, A. T.; HAMMID, A. T.; ENAYATI, A.; MIRZAEI, H.; SALEHI, A.; SOLTANI, A.; MOHAMED, A. Prediction of COVID-19 manipulation by selective ACE inhibitory compounds of Potentilla reptans root: *In silico* study and ADMET profile. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 7, 103942, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103942>.

XU, F.; HUANG, X.; WU, H.; WANG, X. Screening compounds for treating diabetes and COVID-19 from Miao medicine by molecular docking and bioinformatics. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 9, 105001, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105001>.

YANG, W.; MORTIER, W. J. The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 108, n. 19, p. 5708–5711, 1986. <https://doi.org/10.1021/ja00279a008>.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand–protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, D1096–D1103, 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks966>.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2588–2595, 2013.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt447>.

YANG, Y.; YAO, K.; REPASKY, M. P.; LESWING, K.; ABEL, R.; SHOICHET, B. K.; JEROME, S. V. Efficient exploration of chemical space with docking and deep learning. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 17, n. 11, p. 7106–7119, 2021.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00810>.

YIN, W.; MAO, C.; LUAN, X.; SHEN, D.-D.; SHEN, Q.; SU, H.; WANG, X.; ZHOU, F.; ZHAO, W.; GAO, M.; CHANG, S.; XIE, Y.-C.; TIAN, G.; JIANG, H.-W.; TAO, S.-C.; SHEN, J.; JIANG, Y.; JIANG, H.; XU, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; XU, H. E. Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir. **Science**, v. 368, n. 6498, p. 1499–1504, 2020.
<https://doi.org/10.1126/science.abc1560>.

YOOSEFIAN, M.; DASHTI, R.; MAHANI, M.; MONTAZER, L.; MIR, A. A suitable drug structure for interaction with SARS-CoV-2 main protease between boceprevir, masitinib, and rupintrivir; a molecular dynamics study. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 9, 105051, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105051>.

ZHANG, J.; TANG, W.; GAO, H.; LAVINE, C. L.; SHI, W.; PENG, H.; ZHU, H.; ANAND, K.; KOSIKOVA, M.; KWON, H. J.; TONG, P.; GAUTAM, A.; RITS-VOLLOCH, S.; WANG, S.; MAYER, M. L.; WESEMANN, D. R.; SEAMAN, M. S.; LU, J.; XIAO, T.; XIE, H.; CHEN, B. Structural and functional characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron subvariant BA.2 spike protein. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 30, p. 980–990, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01023-6>.

ZHANG, Y.; ZENG, S.; LI, J.; DAI, Y.; CHEN, S.; ZENG, J. Molecular dynamics simulation of the interaction between monofluoronitrobenzene and Ti electrode. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 126, 108644, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2023.108644>.

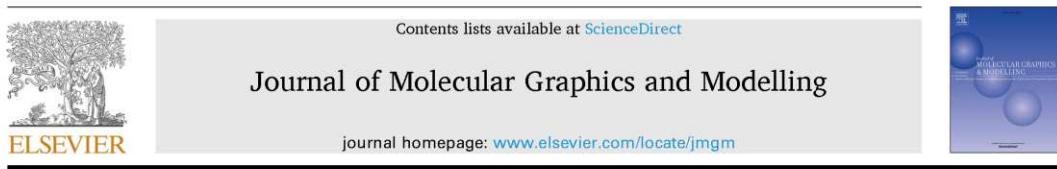
ZHAO, X.; CHEN, H.; WANG, H. Glycans of SARS-CoV-2 spike protein in virus infection and antibody production. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 629873, 2021.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.629873>.

ANEXO A – LISTA DAS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

- ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS INTERNACIONAIS
- 1- In silico investigation of komarovquinona as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM approaches. Santos, S. J. M. & Valentini, A. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 126, 108662, (2024). <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2023.108662>;
- 2- brussonol and komarovquinona as inhibitors of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant spike protein: A molecular docking, molecular dynamics, and quantum biochemistry approach
Santos, S. J. M. & Valentini, A. Journal of Molecular Graphics and Modelling. 135, 108914, (2025). <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2024.108914>.

ANEXO B – GRAVURAS REFERENTE AS PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Journal of Molecular Graphics and Modelling 126 (2024) 108662



In silico investigation of Komarovquinone as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM approaches



Samuel J.M. Santos ^{a,*}, Antoninho Valentini ^b

^a Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande Do Sul, 95770-000, Feliz, Rio Grande Do Sul, Brazil

^b Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Federal University of Ceará, Campus of Pici, 60440-554, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2
Covid-19
Komarovquinone
M^{pro}
QM/MM

ABSTRACT

COVID-19 has highlighted the urgent need for new therapeutic agents to combat the spread of the virus. The main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) has emerged as a promising target. In this study, we conducted an *in silico* investigation to explore the potential of Komarovquinone, an icecane diterpene, as a therapeutic agent against COVID-19. We employed molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM methodologies to compare the binding affinity, molecular interactions, and stability of Komarovquinone and the FDA-approved antiviral drug Nirmatrelvir with the SARS-CoV-2 Mpro protein. The study demonstrated that Komarovquinone exhibits strong interaction with Mpro, with a binding energy comparable to Nirmatrelvir. The ADMET analysis revealed that Barbatosol, Brussonol, and Komarovquinone possess superior solubility, permeability, and intestinal absorption compared to Nirmatrelvir, as well as more favorable distribution properties and lower toxicity profiles. Notably, Nirmatrelvir displayed toxicity and hepatotoxicity, which were not present in the natural compounds. Thus, it is suggested that Komarovquinone may be a promising candidate for the development of effective and safer therapeutic agents against COVID-19. Experimental validation is necessary to confirm its potential as a treatment for the disease.

1. Introduction

Since the outbreak of pneumonia caused by SARS-CoV in 2002 (SARS-CoV) [1], followed by another outbreak of Middle East Respiratory Syndrome in 2012 (MERS-CoV) [2,3], the scientific community has been preparing to confront new respiratory viruses. Unfortunately, in 2019, SARS-CoV-2 emerged with a higher transmission rate, triggering an unprecedented global pandemic that overwhelmed hospitals and disrupted the global economy. The COVID-19 pandemic has become one of the greatest global challenges of the 21st century, with millions of confirmed cases and deaths worldwide. According to recent data from the World Health Organization (WHO), as of May 11, 2023, more than 765 million cases and 6.9 million deaths have been reported due to SARS-CoV-2 [4]. The severity of the situation is alarming, emphasizing the urgent need for research and development of new therapeutic agents to control and potentially eradicate the pandemic. Many studies currently address a critical analysis of the current COVID-19 situation, emphasizing the importance of novel therapeutic strategies to confront

this pandemic disease and the long-term socioeconomic impacts [5,6].

The main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) plays a crucial role in the post-translational processing of viral polyproteins, facilitating viral replication and assembly [7]. Upon viral entry into the cell and release of its RNA, the cellular machinery synthesizes an extensive polyprotein, whose cleavage into individual, functional proteins is essential for successful viral propagation [8]. Mpro recognizes specific cleavage sites within the polyprotein and carries out proteolytic processing in a highly coordinated and regulated manner [9]. Owing to its fundamental role in the viral life cycle, Mpro has emerged as an attractive target for the development of antiviral therapies [10]. The design of potent and selective Mpro inhibitors can effectively disrupt viral replication, offering promising treatment options in the fight against COVID-19 [Fig. 1].

Despite the global availability of vaccines, monoclonal antibodies (mAbs), and approved therapies, SARS-CoV-2 continues to evolve, giving rise to more infectious and resistant variants [6]. The U.S. Food and Drug Administration (FDA) granted emergency use authorization for Paxlovid, an innovative oral Mpro SARS-CoV-2 inhibitor developed by

* Corresponding author.

E-mail addresses: samuel.santos@feliz.ifrs.edu.br (S.J.M. Santos), valent@ufc.br (A. Valentini).



Brussonol and komarovquinone as inhibitors of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant spike protein: A molecular docking, molecular dynamics, and quantum biochemistry approach

Samuel J.M. Santos ^{a,*}, Antoninho Valentini ^b

^a Federal Institute of Education, Science and Technology of Rio Grande Do Sul, 95770-000, Feliz, Rio Grande Do Sul, Brazil

^b Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry, Federal University of Ceará, Campus of Pici, 60440-554, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Antiviral
 SARS-CoV-2
 Omicron
 Icetexane diterpene
 MD simulation
 Molecular docking
 DFT

ABSTRACT

Since late 2019, humanity has faced the challenges posed by the COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus. The continuous evolution of SARS-CoV-2 has led to the emergence of multiple Variants of Concern (VOCs) and Variants of Interest (VOIs), posing significant risks to global health. SARS-CoV-2 infects host cells via the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptors, facilitated by the spike (S) protein. Icetexane diterpenes, including brussonol and komarovquinone, exhibit notable anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, anti-proliferative, and anticancer properties. Recent research has explored their potential as inhibitors of the SARS-CoV-2 3CLpro protease, showing promising efficacy comparable to Nirmatrelvir. This study investigates brussonol and komarovquinone as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant spike protein using molecular docking, molecular dynamics simulations, and quantum biochemistry approaches. The stability and interaction energies of brussonol, komarovquinone, and mefloquine with the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant spike protein were evaluated. RMSD analysis demonstrated that komarovquinone and mefloquine maintain more stable binding poses with the spike protein compared to various NAGs and glycans. Electrostatic potential maps revealed significant interactions with ASN603, a critical residue for ligand binding efficacy. Furthermore, this study addresses a gap in current research, as no studies were found that simulate the trimer of the SARS-CoV-2 BA.2 variant spike protein. Most existing studies focus on the monomer and often exclude the NAGs and glycans. This research underscores the importance of maintaining the NAGs and glycans in the trimer simulations, providing a more accurate representation of the protein's structure and its interactions with ligands. The findings indicate that both komarovquinone and brussonol exhibit higher binding affinities compared to mefloquine. This study provides valuable insights into the molecular interactions of these compounds, highlighting their potential for further development as antiviral agents against SARS-CoV-2.

1. Introduction

Since late 2019, humanity has grappled with the challenges posed by the COVID-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus. As of June 8, 2024, the World Health Organization (WHO) has reported a total of 775.6 million cases of COVID-19 and approximately 7 million deaths attributable to the disease. In response, about 13.59 billion doses of COVID-19 vaccines have been administered worldwide, with 67 % of the global population having completed a primary vaccination series and 32 % having received at least one booster dose [1]. A notable aspect of this pandemic is the continuous evolution of SARS-CoV-2, which has led to the emergence of multiple Variants of Concern (VOCs) and Variants of

Interest (VOIs) [2]. These variants are designated by the WHO based on their assessed potential for expansion and replacement of previous variants, triggering new infection waves with increased circulation and necessitating adjustments in public health strategies. VOCs are variants that, in addition to spreading more rapidly, may cause more severe disease or reduce the effectiveness of available vaccines or treatments. Meanwhile, VOIs are identified by genetic alterations that are predicted or known to influence viral characteristics, including transmissibility, pathogenicity, or the ability to evade immunity. These variants have been implicated in community transmission across several countries, indicating a potential risk to global health [3].

SARS-CoV-2 exhibits a highly specialized mechanism of infection

* Corresponding author.

E-mail addresses: samuel.santos@feliz.ifrs.edu.br (S.J.M. Santos), valent@ufc.br (A. Valentini).