



Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BACABAL - CESB
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO

JESSÉ PINTO FERREIRA

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS PARA AS PROTEÍNAS *Main
Protease* (M^{PRO}) e *Spike* (S) DO SARS-CoV-2 VIA MÉTODO *in silico* A PARTIR DE
ALCALÓIDES DERIVADOS DA *Catharanthus roseus*

Bacabal – MA

2023

JESSÉ PINTO FERREIRA

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS PARA AS PROTEÍNAS *Main Protease* (M^{PRO}) e *Spike* (S) DO SARS-CoV-2 VIA MÉTODO *in silico* A PARTIR DE ALCALÓIDES DERIVADOS DA *Catharanthus roseus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) – Campus Bacabal para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Me. Janilson Lima Souza

Bacabal – MA

2023

F345p Ferreira, Jessé Pinto.

Prospecção de inibidores enzimáticos para as proteínas *Main Protease* (MPRO) e Spike (S) do SARS-CoV-2 via método in silico a partir de alcalóides derivados da *Catharanthus roseus* / Jessé Pinto Ferreira– Bacabal-MA, 2023.

44 f: il.

Monografia (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Estadual do Maranhão-UEMA/ Campus Bacabal-MA, 2023.

Orientador: Profº. Me. Janilson Lima Souza

1. SARS-CoV-2. 2. *Catharanthus roseus* 3. Ancoragem Molecular

CDU: 581.5 : 581.6

Elaborada por Poliana de Oliveira J. Ferreira CRB/13-702 MA

JESSÉ PINTO FERREIRA

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS PARA AS PROTEÍNAS *Main Protease* (M^{PRO}) e *Spike* (S) DO SARS-CoV-2 VIA MÉTODO *in silico* A Partir De ALCALÓIDES DERIVADOS DA *Catharanthus roseus*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) – Campus Bacabal para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Me. Janilson Lima Souza (Orientador)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – Campus Bacabal

Prof. Dr. Odgley Quixaba Vieira

Universidade Estadual do Maranhão – Campus Bacabal

Prof. Me. Raimundo Gierdson Abreu Macedo

Universidade Estadual do Maranhão – Campus Bacabal

À minha família, e em especial, aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me dar forças para continuar seguindo mesmo diante de todas as diversidades que só eu e ele conhecemos durante esta jornada. Sem ele, sem sua força, seu apoio, nos momentos de dificuldades e de vontade de desistir, nada disso seria possível. Graças te dou senhor!

A minha Mãe, Maria Assunção Ferreira, e também ao meu Pai, Francisco Ferreira, que nunca mediram esforços para manter estudos e *robby* relacionados, até mesmo depois da independência financeira.

Aos meus irmãos Danielle, Jessiel, Denise e Gerson que sempre tiveram admiração por minha carreira e apoio no que necessitava. Alguns momentos foram muitos significativos para que esse trabalho chegasse até aqui.

A minha Namorada Mariana Cristina, que até aqui tem me ajudado bastante, pessoa muito incrível e inteligente que conheci durante o curso, também nunca mediu esforço para apoiar ideias, discutir e melhorar algumas.

Ao meu Orientador Me. Janilson Lima Souza, professor do Instituto Federal do Maranhão – *campus* Bacabal, pessoa muito inteligente trabalhadora e compreensível que proporcionou momentos significativos de pesquisa na área que sempre visei aventurar.

A instituição de ensino UEMA, onde sempre tive orgulho de fazer parte, aos professores que marcaram o curso positivamente, Professor Me Raimundo Gierdson Abreu Macedo, professor Dr. Odgley Quixaba Vieira. A todos os meus amigos em especial Josenira dos Santos, pelo apoio e incentivo desde curso de informática, aos meus colegas de trabalho e todas as pessoas que contribuíram direto e indiretamente para conclusão do curso.

RESUMO

Desde o advento da pandemia da COVID-19, milhões de pessoas morreram em função do agravamento da doença que ocasiona sérios danos ao sistema respiratório. Embora já existam diversas vacinas com eficácia comprovada, há ainda a necessidade premente de desenvolvimento de fármacos para o combate desta doença. A prospecção de inibidores enzimáticos via métodos *in silico* é uma alternativa de relevante interesse científico na busca por moléculas antivirais eficazes. O presente estudo tem como objetivo investigar a atividade inibidora enzimática das proteínas *Main Protease* (M^{PRO}) e *Spike* (S) do SARS-CoV-2 via método *in silico* utilizando alcaloides derivados da planta *Catharanthus roseus*. As estruturas 3D dos ligantes provenientes da *Catharanthus roseus* foram obtidas no *PubChem Open Chemistry Database*, enquanto as estruturas cristalográficas das proteínas M^{PRO} (PDB ID: 6lu7) e S (PDB ID: 6slz) foram adquiridas no *Protein Data Bank*. O método de ancoragem molecular foi utilizado para simular as interações entre as moléculas ligantes e os sítios ativos das proteínas-alvo. Realizou-se também estudos *ADMET* e de toxicidade dos principais ligantes formadores de complexos enzimáticos. Avaliaram-se a estabilidade dos complexos formados identificando as interações de *Van der Waals* e ligações de hidrogênio, constantes de inibição enzimática e energias livres de *Gibbs* de ligação. Os principais resultados sugerem que as moléculas *strictosidine*, *isovincoside* e *bannucine* formam complexos enzimáticos de considerável estabilidade química em relação às enzimas M^{PRO} e *Spike*. Testes *ADMET* em geral foram satisfatórios para estes ligantes. Assim sendo, sugere-se que estas moléculas possuem considerável potencial inibidor enzimático anti-COVID-19. Estes achados científicos são de relevante interesse, haja vista abrem caminhos para novas investigações *in vitro* e *in vivo* na prospecção de novos fármacos no combate à COVID-19.

Palavras Chaves: SARS-CoV-2. *Catharanthus roseus*. Ancoragem Molecular

ABSTRACT

Since the advent of the COVID-19 pandemic, millions of people have died due to the worsening of the disease, which causes serious damage to the respiratory system. Although there are already several vaccines with proven efficacy, there is still an urgent need to develop drugs to combat this disease. The prospection of enzymatic inhibitors via in silico methods is an alternative of relevant scientific interest in the search for effective antiviral molecules. The present study aims to investigate the enzymatic inhibitory activity of the Main Protease (M^{PRO}) and Spike (S) proteins of SARS-CoV-2 via in silico method using alkaloids derived from the plant *Catharanthus roseus*. The 3D structures of the ligands from *Catharanthus roseus* were obtained from the PubChem Open Chemistry Database, while the crystallographic structures of the M^{PRO} (PDB ID: 6lu7) and S (PDB ID: 6slz) proteins were acquired from the Protein Data Bank. The molecular docking method was used to simulate the interactions between the binding molecules and the active sites of the target proteins. ADMET and toxicity studies of the main ligands that form enzymatic complexes were also carried out. The stability of the formed complexes was evaluated by identifying the Van der Waals interactions and hydrogen, enzymatic inhibition constants and binding Gibbs free energies. The main results suggest that strictosidine, isovincoside and bannucine molecules form enzymatic complexes with considerable chemical stability in relation to M^{PRO} and Spike enzymes. ADMET tests were generally satisfactory for these binders. Therefore, it is suggested that these molecules have considerable anti-COVID-19 enzymatic inhibitory potential. These scientific findings are of relevant interest, given that they open the way for new in vitro and in vivo investigations in the prospection of new drugs to combat COVID-19.

Key Words: SARS-CoV-2. *Catharanthus roseus*. molecular anchoring

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Estrutura 3D dos ligantes derivados da *Catharanthus roseus*; Carbono (bege), Hidrogênio (branco), Nitrogênio (azul) e Oxigênio (vermelho).21
- Figura 2 - Estrutura em fitas da Main Protease M^{PRO} (PDB ID: 6LU7) do SARS-CoV-2. Vista em cartoon, verde cadeia A e em roxo cadeia B.....22
- Figura 3 - Estrutura em fitas do Complexo proteico entre domínio S1 da proteína *Spike* (PDB ID: 6LZG) do SARS-CoV-2 e enzima ACE2 vista em cartoon, em verde, ACE2 e em laranja domínio S1 da proteína *Spike*22
- Figura 4 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da protease M^{PRO} e o ligante *strictosidine*; (b) Receptor M^{PRO} (superfície verde) contendo o ligante *strictosidine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.29
- Figura 5 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da protease M^{PRO} e o ligante *isovincoside*; (b) Receptor M^{PRO} (superfície verde) contendo o ligante *isovincoside* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.30
- Figura 6 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da protease M^{PRO} e o ligante *bannucine*; (b) Receptor M^{PRO} (superfície verde) contendo o ligante *bannucine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.31
- Figura 7 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da proteína *Spike* e o ligante *strictosidine*; (b) Receptor *Spike* (superfície verde)

contendo o ligante *strictosidine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.

.....32

Figura 8 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da proteína *Spike* e o ligante *isovincoside*; (b) Receptor *Spike* (superfície verde) contendo o ligante *isovincoside* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.

.....33

Figura 9 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da proteína *Spike* e o ligante *bannucine*; (b) Receptor *Spike* (superfície verde) contendo o ligante *bannucine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constantes de inibição enzimática (K_i) e valores de energia livre de Gibbs de ligação (ΔG) para os sistemas complexos obtidos a partir da proteína M^{PRO} e derivados da <i>Catharanthus roseus</i>	25
Tabela 2: Constantes de inibição enzimática (K_i) e valores de energia livre de Gibbs de ligação (ΔG) para os sistemas complexos obtidos a partir da proteína Spike e derivados da <i>Catharanthus roseus</i>	25
Tabela 3: Resumo das interações do tipo hidrofóbicas e de hidrogênio durante a formação dos sistemas complexos entre os três melhores ligantes obtidos com a M^{PRO} e <i>Spike</i>	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. SARS-CoV-2 e a pandemia de COVID-19	13
2.2. Proteínas-alvo M^{PRO} e <i>Spike</i> do SARS-CoV-2	14
2.3. Prospeção de inibidores enzimáticos como estratégia terapêutica	16
2.4. Alcalóides derivados da <i>Catharanthus roseus</i> com potencial farmacológico	17
2.5. Métodos <i>in silico</i> na descoberta de fármacos.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1. Aquisição das estruturas 3D dos alcalóides e das proteínas	21
4.2. Ancoragem Molecular	23
4.3. Predições <i>ADMET</i>	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Análise dos complexos Proteína – Ligante obtidos	24
5.2. Análise dos resultados de predições <i>ADMET</i>	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

A pandemia ocasionada pelo o vírus SARS-CoV-2, da família coronavírus, se espalhou por todos os continentes do globo em pouco tempo após o diagnóstico dos primeiros casos ocorridos em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China (WANG; *et al.*, 2020).

A doença manifestada nas pessoas infectadas é conhecida popularmente como COVID-19, abreviação de "*Coronavirus Disease 2019*" *Word Health Organization* (WHO, 2023), causa insuficiência respiratória aguda grave. Até a data deste artigo mais de 760 milhões pessoas foram infectadas no mundo e 6,9 milhões de mortes (WHO, 2023). O advento da pandemia resultou em um desafio global sem precedentes, levando à busca por estratégias eficazes de tratamento e combate ao SARS-CoV-2.

Uma abordagem promissora nesse sentido é a identificação e análise de moléculas candidatas a inibidores enzimáticos utilizando métodos computacionais de ancoragem molecular. Plantas ricas em alcaloides têm sido amplamente estudadas devido ao potencial farmacológico desses compostos naturais.

Os alcaloides são uma classe diversificada de compostos orgânicos nitrogenados que ocorrem naturalmente em plantas e apresentam uma ampla variedade de atividades biológicas (ANTOUN *et al.*, 2008). Uma espécie de bastante interesse científico consiste na *Catharanthus roseus* (MARQUES; LOPES, 2015), uma planta conhecida popularmente como vinca-de-madagascar. Ao investigar compostos naturais derivados da *Catharanthus roseus* há a possibilidade de se obter moléculas com propriedades farmacológicas interessantes e de toxicidade reduzida, uma vez que alcalóides já são conhecidos por sua atividade biológica em diferentes contextos.

Os métodos *in silico* consistem em uma abordagem computacional baseada em simulações e modelagem molecular na qual é possível investigar as interações moleculares entre os alcalóides da *Catharanthus roseus* e as proteínas *Main Protease* (M^{PRO}) e *Spike* (S) do SARS-CoV-2. Essa estratégia permitirá uma triagem inicial de compostos, identificando aqueles com maior afinidade e potencial inibitório contra as proteínas virais. Além disso, o método *in silico* oferece uma abordagem rápida e de baixo

custo para a seleção inicial de compostos, reduzindo a necessidade de testes laboratoriais extensivos.

O presente estudo teve como objetivo explorar o potencial de alcalóides derivados da *Catharanthus roseus* como inibidores enzimáticos das proteínas M^{PRO} e *Spike* do SARS-CoV-2. Essas proteínas são alvos importantes para o desenvolvimento de terapias antivirais, uma vez que desempenham papéis críticos na replicação viral e interação com as células hospedeiras. Este estudo possui grande relevância por contribuir para com o desenvolvimento de novas terapias antivirais contra o SARS-CoV-2, fornecendo *insights* valiosos sobre a ação dos alcalóides da *Catharanthus roseus* como inibidores enzimáticos. Em outros termos, esta pesquisa pode abrir caminhos para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e acessíveis no combate à COVID-19 oferecendo esperança e soluções inovadoras em meio à crise sanitária global.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. SARS-CoV-2 e a pandemia de COVID-19

A família dos coronavírus, são vírus de RNA envelopados no qual encontra-se o SARS-CoV-2, conhecidos por causar infecções respiratórias em seres humanos, a transmissão ocorre principalmente por meio de gotículas respiratórias quando uma pessoa infectada tosse, espirra ou fala (LANA, 2020). Além disso, o contato próximo com uma pessoa infectada ou o toque em superfícies contaminadas também pode contribuir para a disseminação do vírus (DROSTEN, *et al.*, 2003).

A COVID-19, doença causada pelo SARS-CoV-2, apresenta uma ampla gama de sintomas, desde quadros leves de resfriado comum até casos graves de pneumonia e insuficiência respiratória. Os sintomas mais comuns incluem febre, tosse, falta de ar, fadiga e perda de olfato e paladar (WHO, 2023). No entanto, é importante ressaltar que a doença pode se manifestar de forma assintomática em algumas pessoas, o que dificulta o controle da sua propagação.

A rápida disseminação do SARS-CoV-2 levou a OMS a declarar a pandemia de COVID-19 em março de 2020. Desde então, governos e instituições de saúde de todo o mundo têm implementado medidas para conter a propagação do vírus, como o distanciamento social, o uso de máscaras, a higienização das mãos e a realização de testes em massa.

Além dos impactos na saúde, a pandemia de COVID-19 teve consequências econômicas e sociais significativas. Muitos países adotaram restrições à circulação de pessoas e fechamento de estabelecimentos comerciais, o que resultou em perdas de empregos, redução da atividade econômica e aumento da desigualdade social (LEMOS, 2020).

A busca por soluções para combater o SARS-CoV-2 tem sido intensa. Desde o início da pandemia, cientistas e pesquisadores têm trabalhado arduamente no desenvolvimento de vacinas, medicamentos e métodos de diagnóstico mais eficazes. Esses esforços têm se mostrado promissores, com a aprovação e distribuição de várias vacinas em todo o mundo (ALONSO *et al.*, 2020).

A COVID-19 continua sendo um desafio global, mas os avanços científicos e a colaboração internacional têm sido fundamentais no enfrentamento dessa crise. A conscientização da população, a adoção de medidas preventivas e a vacinação em larga escala são cruciais para controlar a disseminação do vírus e superar essa pandemia.

2.2. Proteínas-alvo M^{PRO} e *Spike* do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 emprega diversas proteínas em seu processo de infecção e replicação nas células humanas. Duas dessas proteínas são de extrema relevância na busca por inibidores eficazes: a *Main Protease* e a proteína *Spike*.

A M^{PRO} desempenha um papel crucial na replicação do vírus, uma vez que é a principal responsável por clivar poliproteínas virais em várias proteínas funcionais que são essenciais para a montagem e maturação viral. Constitui-se basicamente de um dímero de duas subunidades idênticas que juntas formam dois sítios ativos (ULLRICH; NITSCHKE, 2020). A inibição dessa enzima é uma estratégia promissora para interromper a replicação viral e impedir a disseminação da infecção. Portanto, a prospecção de inibidores da M^{PRO} tem sido amplamente explorada como uma abordagem terapêutica potencial para o tratamento da COVID-19.

Outra proteína-alvo importante é a proteína *Spike*, que desempenha um papel fundamental na entrada do vírus nas células humanas, devido a capacidade de se ligar ao receptor *ACE2* presente nas células humanas permitindo que o vírus entre e infecte o organismo (FERRAZ, 2021). A proteína S é uma glicoproteína de pico transmembrana trimérica composta por três cadeias idênticas, que juntas formam um complexo com um pequeno domínio dentro do vírus, um segmento que atravessa a membrana e um grande ectodomínio que se estende para fora do vírus (KIRCHDOERFER *et.al.*, 2019). Além disso, o pico dessa proteína é coberto por cadeias de açúcar que ajudam a mascarar o vírus do sistema imunológico, haja visto em outros estudos onde o sítio ativo de proteínas que também são formados por açúcares, possuem uma domínios de ligação ao receptor em diferentes conformações (KIRCHDOERFER *et.al.*, 2019). O bloqueio da interação entre a *Spike* e o receptor *ACE2* é uma estratégia eficaz para impedir a entrada do vírus nas células e prevenir a infecção.

A estrutura de pico do SARS-COV-2, local onde o vírus realiza a acoplagem com enzima ACE2 é descrita na literatura como domínio de ligação ao receptor (RBD) a mesma possui duas subunidades S1 e S2 (FERRAZ, 2021). Uma dessas subunidades é estendida necessariamente para se ligar aos receptores, então essa flexibilidade é uma grande vantagem para o vírus (KIRCHDOERFER *et al.*, 2019). Os pesquisadores levantam a hipótese de que as variantes recentes da SARS são virulentas porque seus domínios de ligação ao receptor são particularmente flexíveis, enquanto os coronavírus mais difundidos que causam o resfriado comum são menos perigosos porque são menos flexíveis (LANA, 2020).

O ectodomínio dessa proteína RBD possui duas partes funcionais. O fragmento S1, se liga a receptores celulares, e o fragmento S2, direciona a fusão do vírus com a célula (HUANG *et al.*, 2020). Ambas as estruturas incluem apenas porções das muitas cadeias de açúcar que cobrem a crista da proteína, uma vez que os açúcares são altamente flexíveis e difíceis de observar. Logo para que seja possível infectar um outro organismo esse vírus necessita que o hospedeiro possua enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), sendo identificada como o receptor de SARS-CoV (LI *et al.*, 2003).

A prospecção de inibidores para essas proteínas, envolve uma abordagem *in silico*, conhecida como ancoragem molecular, essa técnica computacional visa buscar encaixe ideal entre duas moléculas simulando assim o processo de reconhecimento molecular. A partir da predição de orientação, forma-se um complexo que pode ser usado para estimar a afinidade de ligação ou a força de associação entre as duas moléculas, e com isso, priorizar moléculas que “melhor” se ligam a um parceiro (SANTOS, 2021).

A utilização de técnicas *in silico* para a prospecção de inibidores apresenta vantagens significativas, como a capacidade de analisar uma grande quantidade de compostos em um curto período de tempo e a redução de custos associados a ensaios laboratoriais (GOMES, 2023). Além disso, essa abordagem permite a identificação de compostos potenciais que podem ser otimizados e desenvolvidos posteriormente como candidatos a fármacos.

2.3. Prospecção de inibidores enzimáticos como estratégia terapêutica

A prospecção de inibidores enzimáticos tem emergido como uma estratégia terapêutica altamente promissora no enfrentamento de doenças ocasionadas por diversos patógenos incluído o vírus em estudo. A ideia central de se investigar estes inibidores decorre da possibilidade de se interromper os processos-chave do ciclo de vida do agente patogênico (COSTA *et al.*, 2021). Essa abordagem terapêutica oferece a perspectiva de desenvolver medicamentos eficazes para combater doenças virais, e pode desempenhar um papel fundamental na prevenção e no controle de futuras epidemias e pandemias.

A prospecção de inibidores enzimáticos, envolve a identificação e o desenvolvimento de compostos que possam se ligar e inibir a respectivamente atividade de uma determinada proteína (GURUNG *et al.*, 2020). Métodos *in silico*, como a ancoragem molecular, têm sido amplamente utilizados nesse processo, permitindo a identificação e seleção de candidatos mais promissores para testes experimentais.

Ao desenvolver inibidores enzimáticos eficazes, é possível reduzir a carga viral, controlar a progressão da doença e potencialmente melhorar os desfechos clínicos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 (HANAI, 2022). Além disso, essa abordagem terapêutica pode contribuir para a prevenção de novas infecções, especialmente quando combinada com outras estratégias, como vacinação e medidas de controle epidemiológico.

A prospecção de inibidores enzimáticos direcionados às proteínas *M^{PRO}* e *Spike* do SARS-CoV-2 representa uma estratégia terapêutica promissora no combate à doença COVID-19, oferecendo potencial para interromper a replicação viral e impedir a entrada do vírus nas células hospedeiras. Essa abordagem, aliada a outras medidas de controle da pandemia, pode contribuir significativamente para o controle e mitigação dos efeitos devastadores dessa doença global.

2.4. Alcalóides derivados da *Catharanthus roseus* com potencial farmacológico

Alcalóides são compostos naturais classificados como metabólitos secundários. A maioria é derivada de aminoácidos e são encontrados principalmente nas plantas. Em sua estrutura química existe uma molécula de nitrogênio que pode ou não fazer parte de um anel heterocíclico (VOLLHARDT, 2004).

Os alcalóides derivados da *Catharanthus roseus*, também conhecida como vinca-de-madagascar (MISHRA; VERMA, 2017), têm despertado interesse significativo no campo da pesquisa farmacológica devido ao seu potencial terapêutico. Essa planta é reconhecida por conter uma variedade de alcalóides com propriedades bioativas, que podem ser exploradas no desenvolvimento de medicamentos (MISHRA; VERMA, 2017).

Entre os alcalóides mais conhecidos da *Catharanthus roseus* estão a *Vinblastina* e a *Vincristina*, ambos amplamente utilizados no tratamento de diversos tipos de câncer (FALCÃO, 2016). Essas substâncias têm a capacidade de inibir o crescimento de células cancerígenas, agindo de forma seletiva e direcionada.

Além disso, na literatura é possível encontrar outros alcalóides presentes na *Catharanthus roseus* que têm mostrado atividades farmacológicas promissoras, como propriedades antimaláricas (MONNERAT, 2011), anti-hipertensivas (GERALDO, 2022), analgésicas, anti-inflamatórias (KUMAR; SINGH; SINGH, 2022), e antivirais (WAHAB, 2020). Pesquisas têm demonstrado que esses compostos podem atuar em diferentes alvos moleculares, interferindo em processos metabólicos/fisiológicos virais.

2.5. Métodos *in silico* na descoberta de fármacos

Os métodos *in silico* desempenham um papel crucial na descoberta de novos fármacos, proporcionando uma abordagem computacional eficiente e econômica para a identificação e seleção de compostos com potencial terapêutico. Essas técnicas utilizam modelos e algoritmos para simular e prever as interações moleculares entre os fármacos e seus alvos biológicos (PARANHOS, 2015).

Uma das principais aplicações dos métodos *in silico* é a ancoragem molecular, que envolve a modelagem computacional da interação entre um fármaco candidato e a

proteína alvo (SOUZA, 2015). Essa abordagem permite identificar e avaliar o potencial de ligação do fármaco à proteína alvo, predizendo sua eficácia e seletividade.

A utilização desse método na descoberta de novos fármacos traz vantagens significativas, como a redução de custos e tempo em comparação aos métodos tradicionais (CLARK; PICKETT, 2000) subsidiando tais métodos. Essas técnicas oferecem uma ampla gama de informações sobre a interação fármaco-alvo, permitindo uma seleção mais precisa e racional de candidatos a fármacos.

Bons inibidores geralmente possuem diversas interações dentro do sítio ativo tais como as interações de hidrogênio e de *Van Der Waals*. Contudo, na prática nem sempre é possível investigar tais interações ou medir a estabilidade química do sistema complexo, haja vista que a cinética de inibição enzimática ocorre na escala de *fento* segundos (10^{-15}) ou tempo inferior sobre determinada temperatura (KUMAR, 2022). Comumente, o que se investiga na prática se resume à eficácia do fármaco contra o agente causador da doença e minimização de efeitos adversos ao paciente.

Assim sendo alguns métodos computacionais *in silico* surgem como uma alternativa viável nesta investigação de modo a predizer se um determinado sistema complexo do tipo ligante-proteína possui ou não os pré-requisitos mínimos necessários para se justificar a investigação *in vitro* ou mesmo *in vivo*. No rol dos métodos *in silico* destaca-se a ancoragem molecular.

A ancoragem molecular (AM), ou docagem molecular (DM) é uma metodologia *in silico* que fornece o prognóstico dos modos de ligação de micromoléculas e macromoléculas ao interagirem com um sítio receptor (TAVARES, 2015). De forma genérica o método de ancoragem molecular consiste em criar uma caixa virtual tridimensional cujo centro são as coordenadas do sítio ativo da macromolécula, sendo que neste espaço cúbico o software simula diversas interações entre a molécula ligante e o sítio do receptor enzimático calculando a energia do sistema complexo em cada interação (SÁ *et al.*, 2021). Durante as simulações, a proteína é considerada fixa em relação ao ligante, que possui graus de liberdade em torno da superfície externa da proteína. Geralmente são executadas 100 simulações e os resultados finais são organizados em ordem crescente de energia (SÁ *et al.*, 2021). A pose (ou encaixe) de interesse considerada para fins de discussão é sempre a de menor energia de *Gibbs*.

Energia na ordem de 1×10^{-8} *Joule* ou menor são consideradas bastante favoráveis do ponto de vista termodinâmico (COSTA *et al.*, 2021).

Esta metodologia, além de estimar a energia do sistema complexo, também permite o cálculo da constante de inibição enzimática e também os modos de interação do ligante dentro do sítio ativo do receptor (Interações de *Van Der Waals* e interações de hidrogênio). Cabe ressaltar ainda que simulações *in silico* demandam menos recursos financeiros, menor tempo de elucidação de problemas químicos, auxiliando os estudos *in vitro* e *in vivo* na busca por moléculas com reais potenciais farmacológicos.

A literatura registra diversos trabalhos a partir do uso da metodologia de ancoragem molecular na investigação de novos fármacos. (ENMOZHI *et al.*, 2021) investigaram a interação entre *Andrographolide* como potencial ligante inibidor para M^{PRO} que é fornecida com um sítio de inibição (PDB ID: 6LU7) (JIN, *et al.*, 2020). Estes autores demonstraram que as moléculas *Andrographolide* possui energia de *Gibbs* igual a -3,094 *KJ/mol*, apresentaram uma boa atividade inibitória enzimática. Também vale ressaltar pesquisa realizada por (MISHRA, *et al.*, 2021) que identificaram compostos oriundos da *cumarina* interagem ativamente com os receptores captados e mostraram bons resultados de encaixe para M^{PRO} , neste estudo a energia de *Gibbs* identificada foi de (ΔG ligante = $-6,01 \text{ Kcal.mol}^{-1}$). Compostos originados a partir de constituídos de Buriti (*Mauritia flexuosa L.*) apresentaram energias de interação favoráveis na formação do complexo *2GTB peptidase* (principal *peptidase* do SARS-CoV) com os estratos as energias de *Gibbs* foram no intervalo de (ΔG ligante = $-8,34 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) para o composto com menor interação e (ΔG ligação = $-10,23 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) para composto com maior grau de interatividade entre com sítio ativo da proteína (COSTA *et al.*, 2021). Pesquisas demonstram que alcaloides oriundos da *Catharanthus roseus*, apresentam atividade inibitória para *Trypanosoma cruzi*, evidenciando interatividade com sítio ativo do agente etiológico e energia de *Gibbs* igual a (ΔG ligação = -11 Kca.Mol^{-1}) (SOUZA *et al.*, 2022). Outra pesquisa envolvendo extratos da *Catharanthus roseus* comprovou eficiência de alguns alcaloides em inibir proteína M^{PRO} apresentando interatividade e energia de *Gibbs* próximo a (ΔG ligação $\approx -12 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) e entre alcaloides da planta e sítio ativo da proteína (ALENCAR, 2022; FERREIRA, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a prospecção de inibidores enzimáticos para as proteínas *Main Protease* (M^{PRO}) e *Spyke* (S) do SARS-CoV-2 via método *in silico* a partir de alcalóides derivados da *Catharanthus roseus*.

3.2. Objetivos específicos

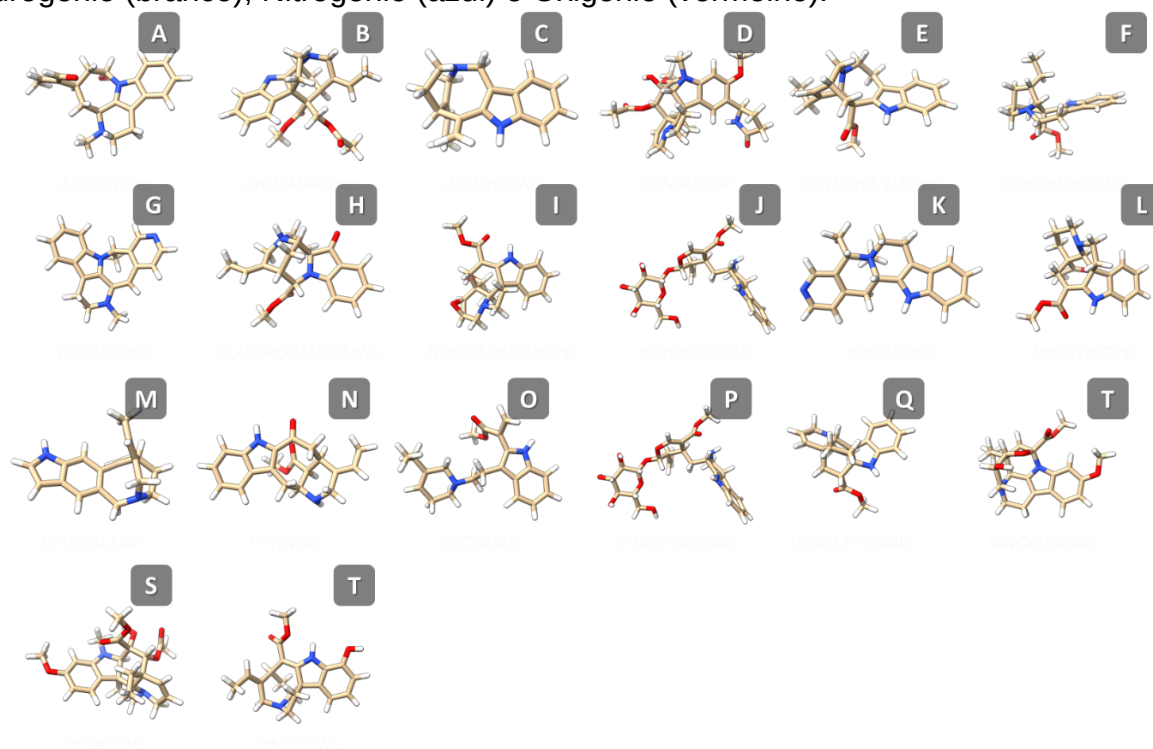
- Realizar a ancoragem molecular dos ligantes investigados em relação ao sítio ativo das proteínas M^{PRO} e *Spyke* do SARS-CoV-2;
- Determinar as energias de interação e constantes de inibição de cada ligante estudado em relação à *Main Protease* e *Spyke*;
- Definir os principais resíduos de aminoácidos interagentes e principais tipos de interações intermoleculares dentro do sítio ativo;
- Investigar as características farmacocinéticas e farmacológicas dos ligantes selecionados;
- Identificar dentre os ligantes estudados, os ligantes com maior efeito inibidor enzimático em relação à *Main Protease* e *Spyke*;

4. METODOLOGIA

4.1. Aquisição das estruturas 3D dos alcalóides e das proteínas

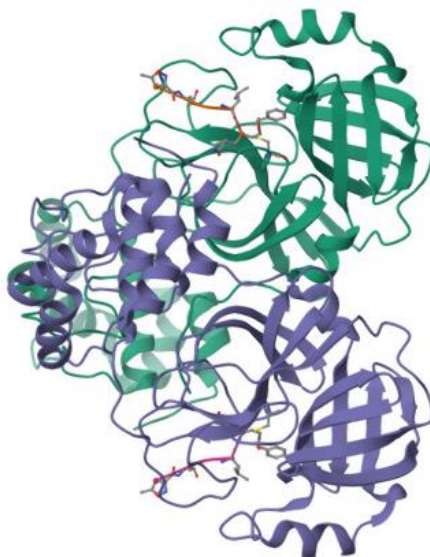
As estruturas 3D dos ligantes, provenientes da *Catharanthus roseus* foram (A) *akagerine*, (B) *akuammiline*, (C) *apparicine*, (D) *bannucine*, (E) *catharanthine*, (F) *coronaridine*, (G) *decussine*, (H) *fluorocarpamine*, (I) *horhammericine*, (J) *isovincoside*, (K) *malindine*, (L) *minovincinine*, (M) *pericalline*, (N) *perivine*, (O) *secodine*, (P) *strictosidine*, (Q) *venalstonine*, (R) *vincarodine*, (S) *vindoline*, (T) *vinervine*. Tais estruturas foram adquiridas por meio do *PubChem Open Chemistry Database* (KIM *et al.*, 2016; KADAN, 2007). Já a estrutura cristalográfica das proteínas *M^{PRO}* (PDB ID: 6LU7) e *Spike* (PDB ID: 6LZG) foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000).

Figura 1 - Estrutura 3D dos ligantes derivados da *Catharanthus roseus*; Carbono (bege), Hidrogênio (branco), Nitrogênio (azul) e Oxigênio (vermelho).



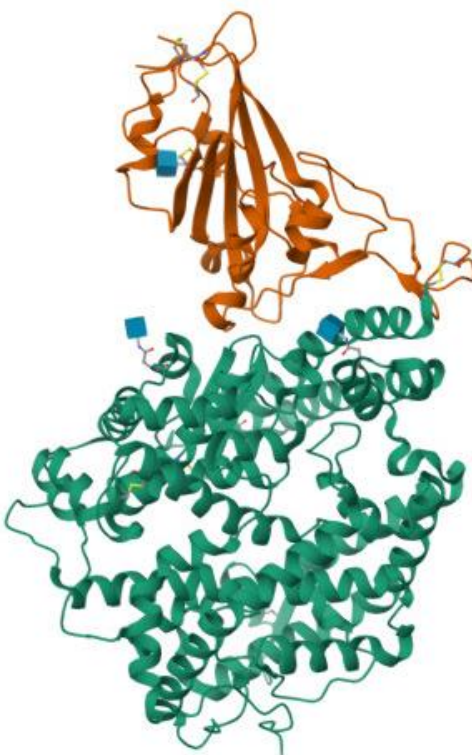
(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 2 - Estrutura em fitas da Main Protease M^{PRO} (PDB ID: 6LU7) do SARS-CoV-2. Vista em cartoon, verde cadeia A e em roxo cadeia B.



(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 3 - Estrutura em fitas do Complexo proteico entre domínio S1 da proteína *Spike* (PDB ID: 6LZG) do SARS-CoV-2 e enzima ACE2 vista em cartoon, em verde, ACE2 e em laranja domínio S1 da proteína *Spike*



(Fonte: Elaborado pelo autor)

4.2. Ancoragem Molecular

O método de AM foi realizado através do *software Autodock 4.2* (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS *et al.*, 2007). Cada ligante *setup* foi preparado para simulação juntamente com a *protease M^{PRO}* e *Spike*. Tais proteínas foram consideradas rígidas, enquanto os ligantes flexíveis.

As cargas parciais de Gasteiger (GASTEIGER, 1980) foram calculadas logo após a adição de todos os hidrogênios. A caixa de grade foi centralizada nas coordenadas tridimensionais $x = -16.406$; $y = 13.719$; $z = 67.212$, para *M^{PRO}* (SÁ *et al.*, 2021) e as coordenadas $x = -31.495$; $y = 24.224$; $z = -14.498$, para *Spike* (PRASANTH *et al.*, 2021) com tamanho cúbico de 60X60X60 pontos, espaçamento de 0,375Å. As interações hidrofóbicas e Ligação de hidrogênio foram analisadas com o *software Ligplot+* versão 2.2 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011). O algoritmo genético Lamarckiano (LGA) de pesquisa global e os métodos pseudo-Solis e Wets de pesquisa local (LS) (MORRIS *et al.*, 1998; SOLIS; WETS, 1981) foram aplicados para a pesquisa de ancoragem molecular. Por sua vez, as simulações de acoplamento para cada ligante *setup* foram submetidas à 100 execuções independentes (RAMOS *et al.*, 2012).

O arquivo “.*dgl*” foi gerado pelo AutoDock apresentando as informações sobre a execução do processo de interação enzimática com os ligantes. Destacou-se os três melhores resultados obtidos para os pares receptor-ligante de cada proteína.

4.3. Predições ADMET

A obtenção das propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos ligantes ocorreram via plataforma *online PreADMET* (KAR; ROY; LESZCZYNSKI, 2018) e *AdmetLab2.0* (XIONG, *et al.*, 2021).

Os parâmetros analisados foram Absorção Intestinal Humana (AIH), Penetração na Barreira Hematoencefálica (BBB), Regra de *Lipinski*, permeabilidade em células *Caco2* e *MDCK* (rim canino Madin-Darby) e Mutagenicidade da espécie Ames *Salmonella* (TA100 e TA1535).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise dos complexos Proteína – Ligante obtidos

Para cada sistema enzimático investigado foram extraídas informações de relevante interesse tais como a energia de *Gibbs* de ligação (ΔG) e a constante de inibição enzimática (K_i). Outras informações relevantes consistiram na elucidação dos terminais de aminoácidos proteicos interagentes de cada proteína com as moléculas ligantes estudadas revelando os tipos de interações que ocorrem entre os candidatos à fármacos e o sítio ativo de cada proteína. As tabelas 1 e 2 apresentam os valores das constantes de inibição enzimática (K_i) e as energias livres de *Gibbs* de ligação (ΔG) respectivamente para os complexos enzimáticos obtidos a partir da *M^{PRO}* e *Spike* com os ligantes derivados da *Catharanthus roseus*. Os valores da energia livre de *Gibbs* de ligação (ΔG) revelam a estabilidade do sistema complexo formado. Quanto menor for a energia apresentada, maior será a estabilidade termodinâmica do sistema formado. A constante de inibição enzimática (K_i) revela a barreira energética necessária para a formação destes sistemas complexos. Neste sentido, quanto menor for a constante de inibição enzimática, mais facilmente a formação do sistema complexo ocorrerá (COSTA *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020).

Ao analisar as tabelas 1 e 2, com base nos critérios de energia livre de *Gibbs* de ligação constatou-se que a *strictosidine* apresenta a menor energia de *Gibbs* na formação dos complexos tanto para a proteína *M^{PRO}* ($\Delta G = -14,04 \text{ Kcal.mol}^{-1}$) quanto também para a Proteína *Spike* ($\Delta G = -13,04 \text{ Kcal.mol}^{-1}$). Consequentemente, as melhores constantes de inibição enzimática (K_i) obtidas também foram para estes mesmos sistemas sendo iguais a $0,0513 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,278 \times 10^{-9} \text{ mol. L}^{-1}$, respectivamente para os complexos com a proteína *M^{PRO}* e proteína *Spike*. Estes achados evidenciam uma alta afinidade do ligante pelos sítios ativos enzimáticos estudados revelando possível potencial inibitório para a atividade proteica destas proteínas.

Tabela 1: Constantes de inibição enzimática (K_i) e valores de energia livre de Gibbs de ligação (ΔG) para os sistemas complexos obtidos a partir da proteína M^{PRO} e derivados da *Catharanthus roseus*.

Ligante investigado	Constante de inibição enzimática ($K_i / \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$)	Energia livre de Gibbs de ligação ($\Delta G/ \text{ Kcal.mol}^{-1}$)
Strictosidine	0,051	-14,04
Isovincoside	0,181	-13,29
Bannucine	0,439	-12,77
Secodine	11,84	-10,81
Vincarodine	21,51	-10,46
Catharanthine	28,19	-10,30
Akagerine	28,58	-10,29
Vindoline	29,52	-10,27
Decussine	41,79	-10,07
Horhammericine	48,81	-9,97
Malindine	49,73	-9,96
Vinervine	67,39	-9,78
Fluorocarpamine	72,69	-9,74
Venalstonine	112,47	-9,48
Minovincinine	155,82	-9,29
Akuammiline	243,52	-9,02
Perivine	275,39	-8,95
Coronaridine	362,78	-8,79
Apparicine	742,61	-8,36
Pericalline	1820,00	-7,83

(Fonte: Elaborado pelo autor)

Tabela 2: Constantes de inibição enzimática (K_i) e valores de energia livre de Gibbs de ligação (ΔG) para os sistemas complexos obtidos a partir da proteína *Spike* e derivados da *Catharanthus roseus*.

Ligante investigado	Constante de inibição enzimática ($K_i / \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$)	Energia livre de Gibbs de ligação ($\Delta G/ \text{ Kcal.mol}^{-1}$)
Strictosidine	0,278	-13,04
Isovincoside	0,723	-12,47
Bannucine	2.92	-11,64
Horhammericine	21.25	-10,47
Minovincinine	24.18	-10,39
Vincarodine	55.57	-9,90
Secodine	64.41	-9,81
Akagerine	74.36	-9,73
Vinervine	127.61	-9,41
Vindoline	241.19	-9,03
Fluorocarpamine	268.62	-8,96
Coronaridine	373.31	-8,77
Venalstonine	392.26	-8,74
Perivine	414.50	-8,71
Decussine	569.20	-8,52
Akuammiline	624.34	-8,46
Malindine	724.99	-8,38
Apparicine	857.56	-8,28
Pericalline	961.24	-8,21
Catharanthine	-----	0,89

(Fonte: Elaborado pelo autor)

De modo análogo, destacam-se outros dois ligantes a saber: *isovincoside* e *bannucine*. A *isovincoside* apresentou a segunda melhor energia livre de Gibbs de ligação para ambos sistemas complexos sendo igual a $-13,29 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ($K_i = 0,181 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$) para proteína *M^{PRO}* e $-12,47 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ($K_i = 0,723 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$) para a Proteína *Spike*. Já a *bannucine* apresentou a terceira melhor energia livre de Gibbs de ligação para ambos sistemas complexos sendo igual a $-12,77 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ($K_i = 0,439 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$) para proteína *M^{PRO}* e $-11,64 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ($K_i = 2,92 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$) para a Proteína *Spike*. Em tese, estes valores são considerados extremamente bons do ponto de vista científico quando se trata de sistemas inibidores enzimáticos.

A análise das interações entre proteína e ligante, tornam-se passo primordial para o entendimento e a compreensão do mecanismo de inibição gerado por estes ligantes (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995). Assim sendo é possível fazer previsões acerca dos terminais de aminoácidos interagentes com as moléculas destacadas anteriormente. Estes resultados se encontram ilustrados nas figuras 4 a 9 via esquema LIGPLOT+, ou seja, representações esquemáticas em 2D das ligações entre proteínas via terminais de aminoácidos e ligantes utilizados. Contatos hidrofóbicos e interações do tipo hidrogênio podem ser perfeitamente reconhecidos nesta avaliação. A força dessas interações de hidrogênio depende da distância entre as interações de hidrogênio formadas e os resíduos de aminoácidos correspondentes (OLIVEIRA, 2012). A tabela 3 resume, para cada ligante, as interações do tipo hidrofóbicas e de hidrogênio em relação às duas proteínas investigadas.

Tabela 3: Resumo das interações do tipo hidrofóbicas e de hidrogênio durante a formação dos sistemas complexos entre os três melhores ligantes obtidos com a M^{PRO} e *Spike*.

Tipo de Interação		
	Hidrofóbica	Hidrogênio
Complexo Ligante - M^{PRO}		
<i>Strictosidine</i>	<i>Pro168; Gln189; Met165; Gly143; Thr26; Thr25; Leu27; His41; Asn142; Ser144; Cys145; Leu141; His164; Glu166; Ala191.</i>	<i>Thr190; Arg188; Gln192</i>
<i>Isovincoside</i>	<i>Pro168; Leu167; Gln189; His164; Met49; His41; Cys145; Leu27; Thr26</i>	<i>Glu166; Met165; Arg188; Gln192; Thr190;</i>
<i>Bannucine</i>	<i>Arg188; Pro168; Gln189; Met165; Met49; His164; His41; Gly143; His163; Phe140; Asn142; His172</i>	<i>Glu166; Leu141; Ser144; Cys145</i>
Complexo Ligante - <i>Spike</i>		
<i>Strictosidine</i>	<i>Trp349; Ala348; Ala99; Phe390; Gly352; Tyr385; Leu351; Phe40</i>	<i>Leu391, Lys562, Asn394; Arg393; Asp350</i>
<i>Isovincoside</i>	<i>Asp382; Phe40; Ser44; Trp349</i>	<i>Ala348; Asn394; Arg393; Phe390; Asp350.</i>
<i>Bannucine</i>	<i>Ser44; Leu351; Phe40; Phe390; Gly352, Arg393, His401, Tyr385; Asp382, Ans394, Ala348, Trp349.</i>	<i>Ser47; Asp350</i>

(Fonte: Elaborado pelo autor)

Avaliando os resultados da tabela 3 nota-se que os três ligantes apresentaram um número considerável de interações seja do tipo hidrofóbicas ou mesmo de hidrogênios. Em tese geral, quanto mais interações no sítio ativo, maior será a estabilidade química do complexo gerado. Contudo algumas observações devem ser melhor refinadas.

Embora o ligante *strictosidine* tenha apresentado apenas três interações do tipo hidrogênio com os resíduos de aminoácidos *Thr190; Arg188* e *Gln192* no complexo ligante – M^{PRO} , um quantitativo menor quando comparado com a *isovincoside* (com cinco interações de hidrogênio com os terminais *Glu166; Met165; Arg188; Gln192* e *Thr190*) e *bannucine* (quatro interações com os terminais de aminoácidos *Glu166; Leu141; Ser144* e *Cys145*), a *strictosidine* apresentou um maior quantitativo de interações do tipo hidrofóbicas, sendo um total de quinze interações, contra nove interações hidrofóbicas da *isovincoside* e doze interações hidrofóbicas da *bannucine*. Se compararmos em termos energéticos as duas melhores moléculas, há uma diminuição de 750 cal/mol a

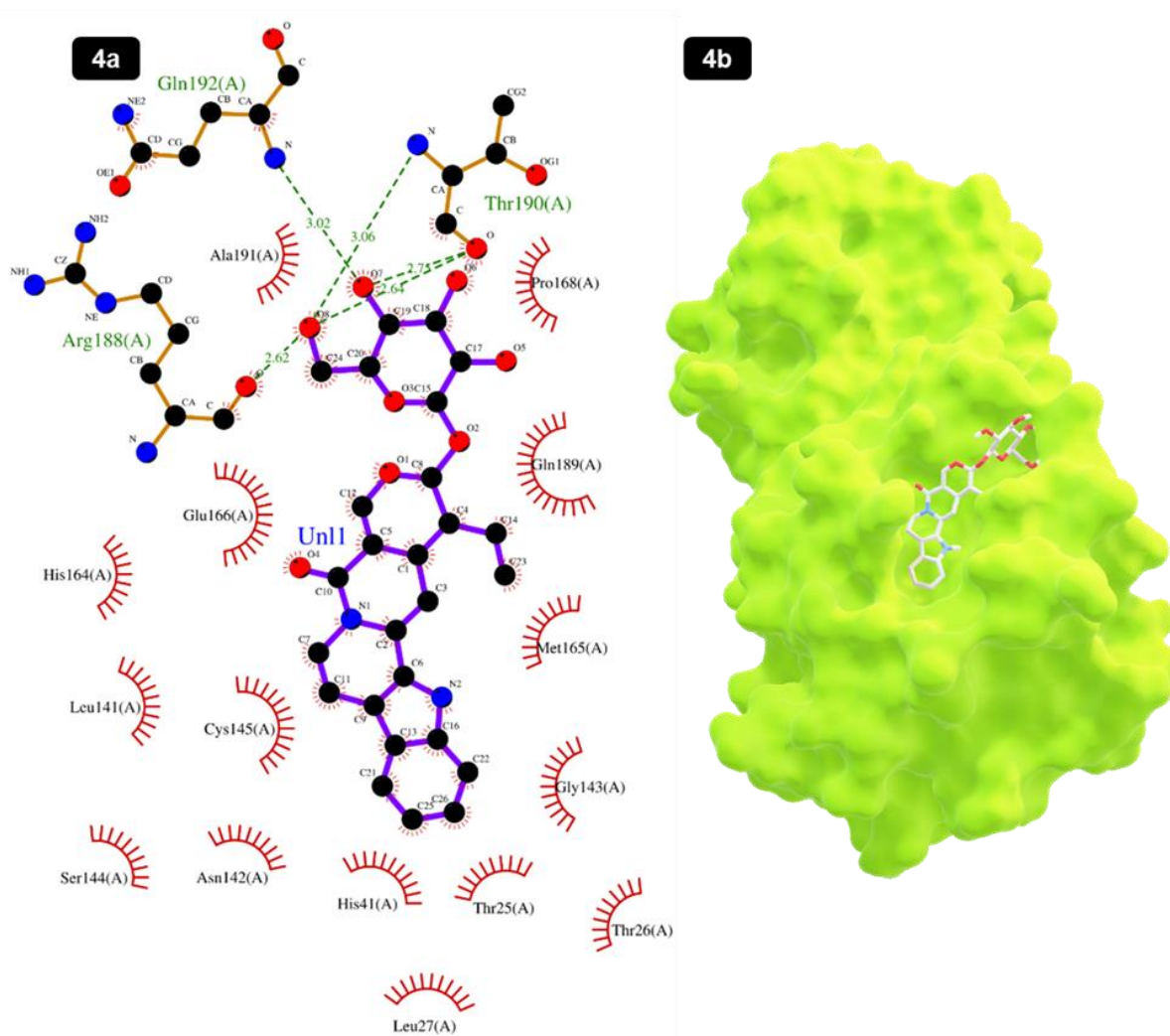
favor da *strictosidine* em relação a *isovincoside*, de modo a tornar o sistema complexo *strictosidine* - M^{PRO} o mais estável.

De modo semelhante, as interações hidrofóbicas para o mesmo ligante (*strictosidine*) foram fundamentais para gerar maior estabilidade termodinâmica no sistema complexo com a proteína *Spike*, haja vista que tanto a *strictosidine* e a *isovincoside* apresentaram simultaneamente quatro interações de hidrogênio a saber: *strictosidine* interagiu com os terminais de aminoácidos *Leu391*, *Lys562*, *Asn394*; *Arg393* e *Asp350*, enquanto a *isovincoside* interagiu com os terminais de aminoácidos *Ala348*; *Asn394*; *Arg393*; *Phe390* e *Asp350*, no entanto a *strictosidine* apresentou oito interações do tipo hidrofóbicas, sendo o dobro de interações obtidas no sistema complexo *isovincoside* – *Spike*. Em termos energéticos há uma diminuição de 570 cal/mol a favor da *strictosidine* em relação a *isovincoside*, de modo a tornar o sistema complexo *strictosidine* - M^{PRO} o mais estável.

Este relato demonstra que, apesar do fato das interações hidrofóbicas serem mais fracas que as interações de hidrogênios, estas não podem ser negligenciadas em termos de energia, pois quando atuam de forma conjunta contribuem de forma significativa para a estabilidade termodinâmica do sistema complexo formado.

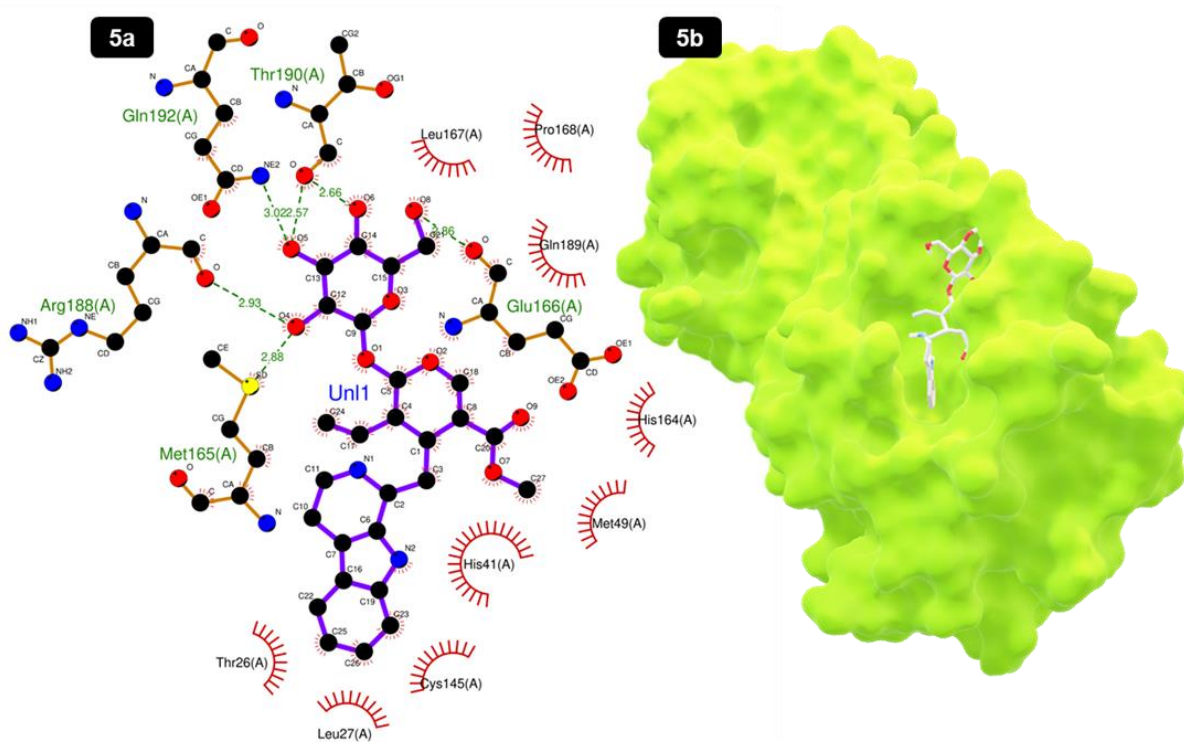
Outro fato observado de extrema relevância foi o fato dos dois melhores ligantes investigado na formação do complexo ligante – M^{PRO} apresentaremos mesmos padrões de interação do tipo hidrogênio (principal tipo de interação) com os resíduos de aminoácidos *Thr190*; *Arg188* e *Gln192*. Isto evidencia que a região das coordenadas destes terminais é de fato o sítio ativo energético da macromolécula. Fato semelhante ocorreu com o sistema proteico obtido a partir da *Spike*. Os mesmos ligantes interagiram nos mesmos terminais de aminoácidos da proteína *Spike*, neste caso os resíduos *Asn394*; *Arg393*; *Asp350*. Isto evidencia que a região de coordenadas destes resíduos atua como o sítio receptor da macromolécula.

Figura 4 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da protease M^{PRO} e o ligante *strictosidine*; (b) Receptor M^{PRO} (superfície verde) contendo o ligante *strictosidine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.



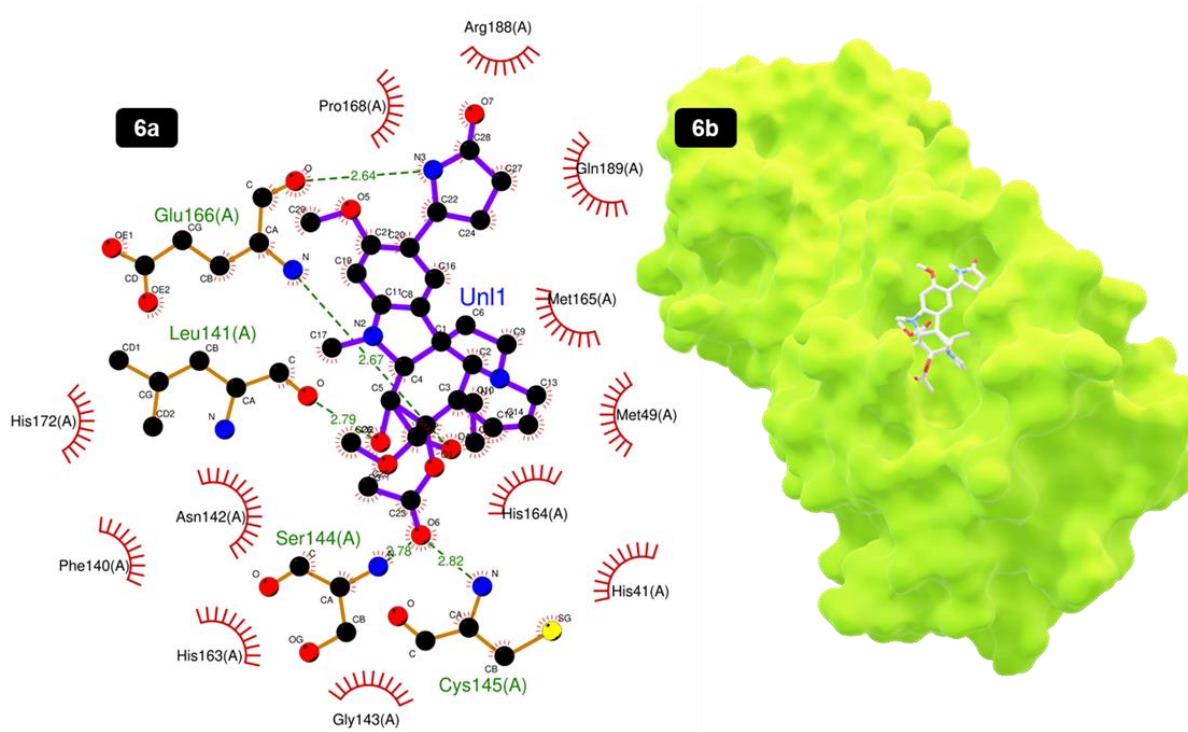
(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 5 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da protease M^{PRO} e o ligante *isovincoside*; (b) Receptor M^{PRO} (superfície verde) contendo o ligante *isovincoside* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.



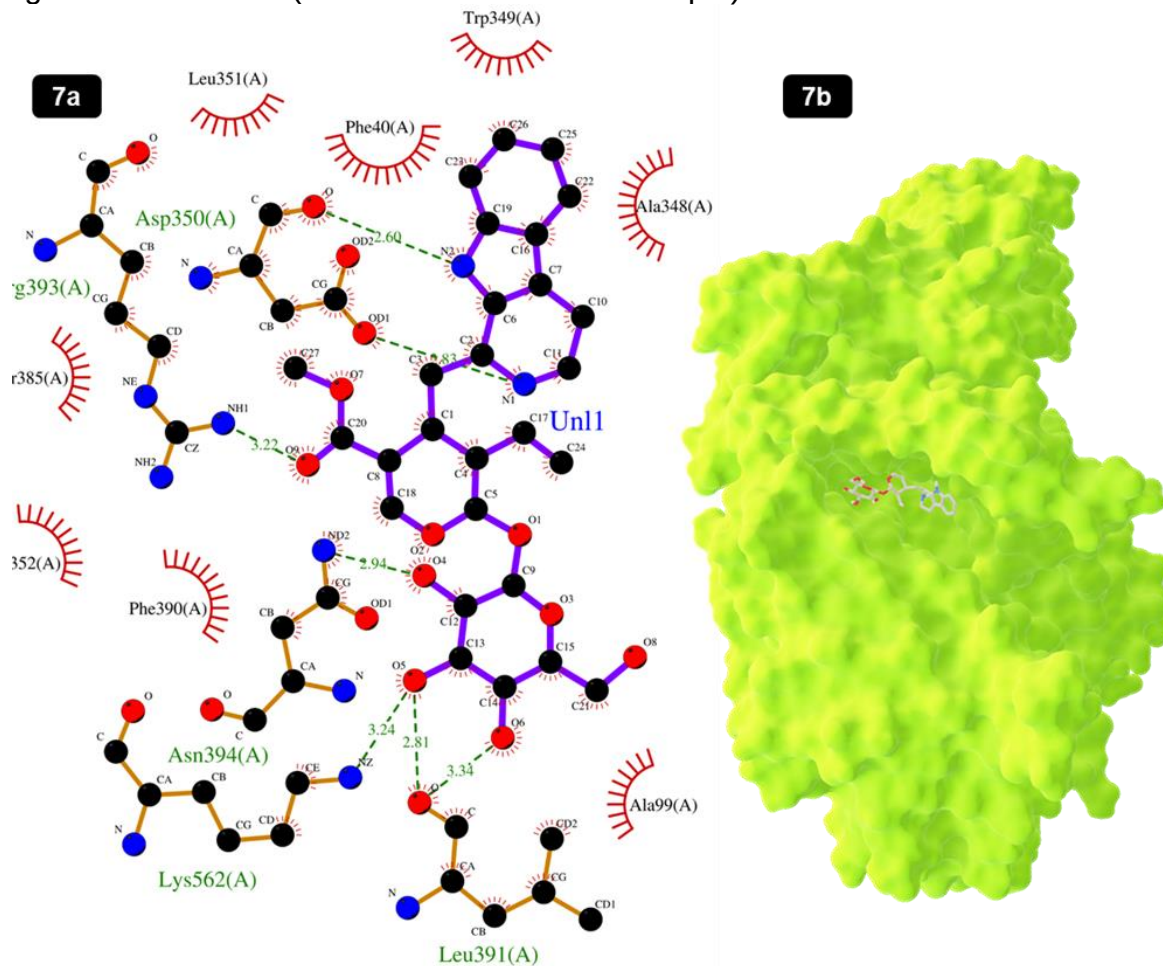
(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 6 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da protease M^{PRO} e o ligante *bannucine*; (b) Receptor M^{PRO} (superfície verde) contendo o ligante *bannucine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.



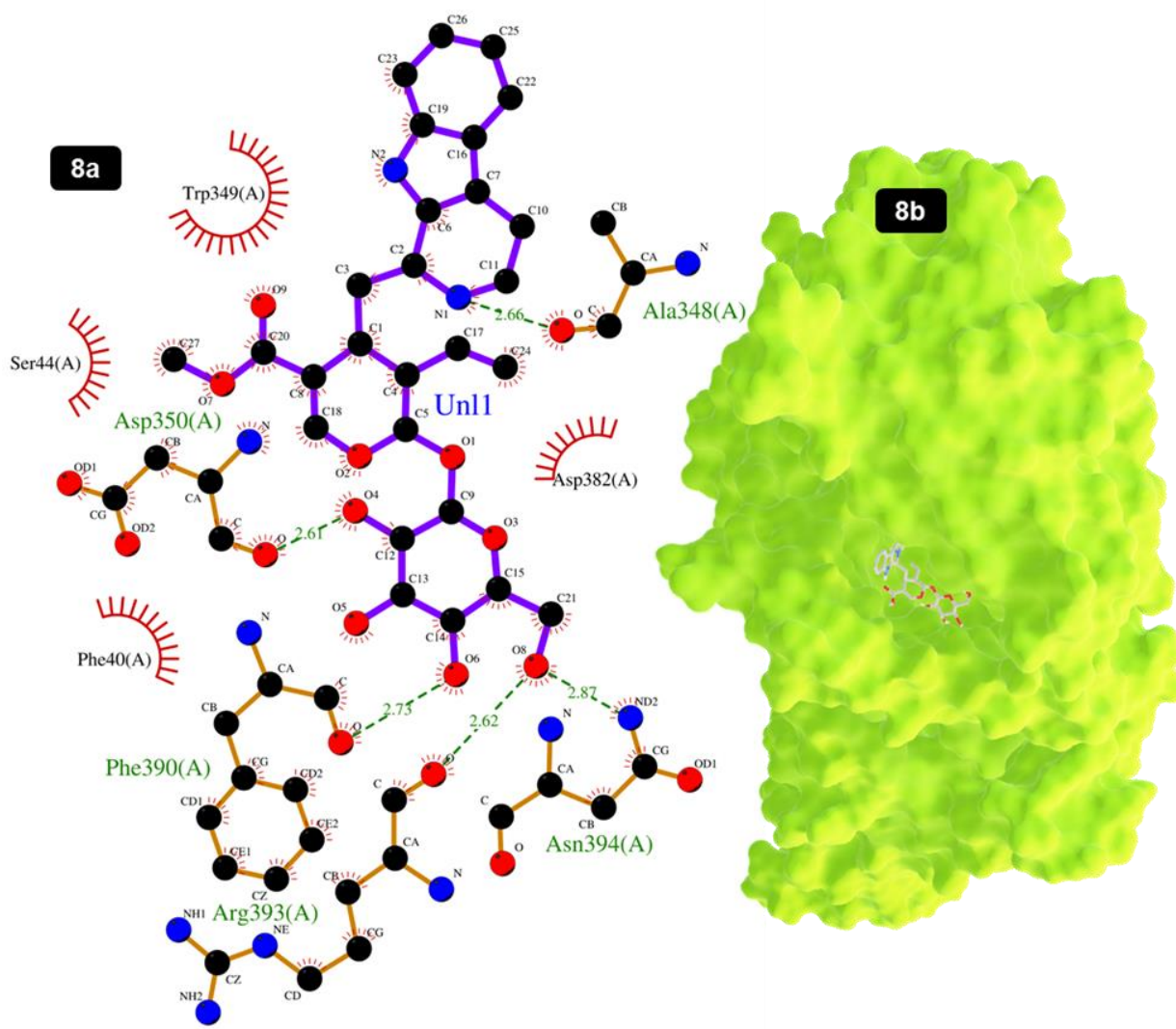
(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 7 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da proteína *Spike* e o ligante *strictosidine*; (b) Receptor *Spike* (superfície verde) contendo o ligante *strictosidine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.



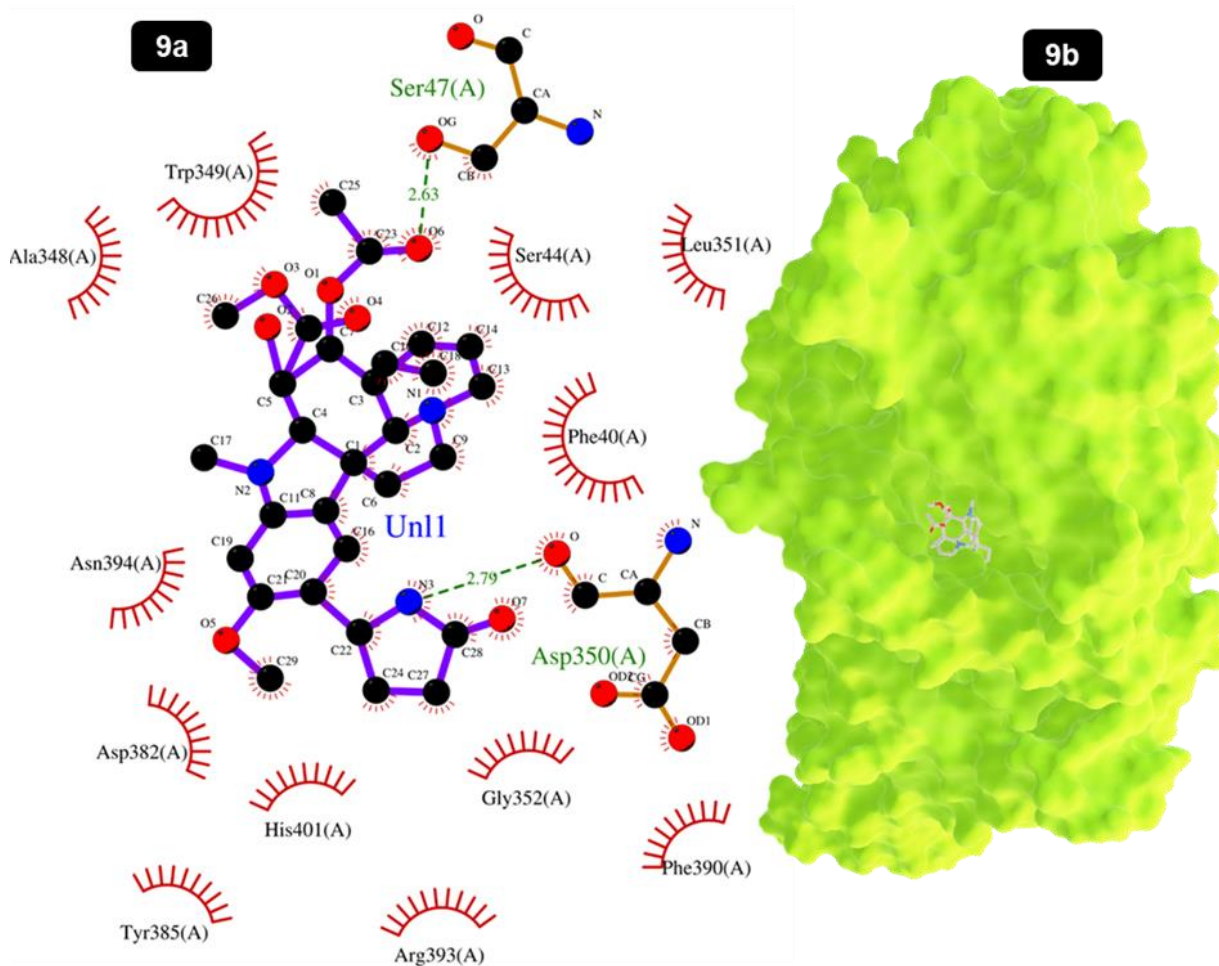
(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 8 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da proteína *Spike* e o ligante *isovincoside*; (b) Receptor *Spike* (superfície verde) contendo o ligante *isovincoside* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.



(Fonte: Elaborado pelo autor)

Figura 9 - (a) Diagrama *LigPlot+* das interações hidrofóbicas (detalhes em traços vermelho) e de hidrogênio (linhas tracejadas) entre os resíduos de aminoácidos da proteína *Spike* e o ligante *bannucine*; (b) Receptor *Spike* (superfície verde) contendo o ligante *bannucine* (bastões brancos em destaque) no sítio ativo.



(Fonte: Elaborado pelo autor)

5.2. Análise dos resultados de predições ADMET

A análise farmacológica dos alcaloides da *Catharanthus roseus* foi possível através do seu Código *Simplified Molecular Input LineEntrySpecification (SMILES)*, adquiridos diretamente do site *Pubchem*, este código é composto de letras e números em uma única linha contínua, que guarda todas as informações sobre a estrutura e particularidades do composto.

O Código *SMILE* de cada molécula funcionou como arquivo de entrada para análise pelo *software on-line Admetlab 2.0*, após a inserção do código alfanumérico, o programa gera várias informações sobre as propriedades físico-química, Toxicidade, Dados Medicinais, Absorção, Distribuição e Excreção. Esses dados foram baixados e tabulados em planilhas eletrônicas para filtrar as informações necessária para realizar este trabalho.

Tabela 4. dos alcaloides com maior afinidade para a formação dos sistemas complexos enzimáticos do tipo ligante – *M^{PRO}* e ligante – *Spike*.

Propriedade investigada	Ligantes		
	<i>Strictosine</i>	<i>Isovincoside</i>	<i>Bannucine</i>
IAH	0,92	0,92	0,95
BBB	0,73	0,73	0,49
Regra de Lipinski	Rejeitado	Rejeitado	Aceito
Caco-2	-5,74	-5,747	-5,224
Permeabilidade em células MDCK	$1,73 \times 10^{11}$	$1,89 \times 10^{11}$	$5,39 \times 10^9$
Multagenicidade Ames	0,54	0,48	0,04

(Fonte: Elaborado pelo autor)

O índice de absorção intestinal humana (IAH) é uma medida que indica a eficiência com que um composto é absorvido pelo intestino humano. Para valores menores que 0,20 implica em uma baixa absorção; valores entre 0,20 e 0,70 constituem uma absorção moderada; valores superiores a 0,70 sugerem uma elevada absorção (YEE, 1997). A análise mostrou que os três compostos selecionados possuem HIA eficiente.

O parâmetro *Blood Brain Barrier – BBB* (Barreira Sangue-Cérebro) descreve o nível de absorção adquirido via barreira hematoencefálica. Para valores superiores a 2,0

a probabilidade de absorção pelo sistema nervoso central poderá ser elevada. Se o valor estiver entre 2,0 e 0,1, a probabilidade de absorção é considerada média. Valores inferiores a 0,1 sugerem uma baixa absorção pelo sistema (MA; CHEN; YANG, 2005). Os ligantes investigados classificam-se como moléculas de absorção média pelo sistema nervoso central.

A regra de *Lipinski* estabelece cinco critérios físico-químicos que são considerados importantes em relação a biodisponibilidade do fármaco no organismo: Número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ; Número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 ; Massa molecular ≤ 500 ; Lipofilicidade ≤ 5 . Pelo menos três destes parâmetros devem ser atendidos para se considerar o fármaco biodisponível para absorção (LIPINSKI, *et al.*, 1997). Os ligantes *strictosine* e *isovincosine* não atendem a esta regra.

A avaliação da absorção em células *Caco-2*, células derivadas de *adenocarcinoma de cólon humano*, é importante pois contribuem no sentido de se compreender a absorção e o metabolismo do candidato a fármaco no intestino grosso (DING *et al.*, 2021). Valores inferiores a 4 implicam em baixa absorção, enquanto que valores entre 4 a 70 ocorre média absorção, e, por fim, absorção elevada para valores superiores a 70 (YAZDANIAN *et al.*, 1998). Os valores determinados para os ligantes investigados foram valores negativos para a permeabilidade dos compostos. Isso indica que esses compostos podem ter dificuldade em atravessar a barreira intestinal.

Contudo este resultado diverge quando se analisa os mesmos sistemas via células MDCK. As células MDCK (*Rim Canino Madin-Darby*) também são sistemas interessantes para se estudar a permeabilidade de moléculas. Valores inferiores a 25 evidenciam uma baixa permeabilidade. A permeabilidade média ocorre para padrões entre 25 a 500, enquanto valores superiores a 500 evidenciam uma alta permeabilidade (WADAPURKAR *et al.*, 2018). As moléculas investigadas neste trabalho possuem alta permeabilidade. A alta permeabilidade nessas células é um indicativo positivo, pois sugere que os compostos têm a capacidade de atravessar a barreira intestinal de forma eficiente. Isso é desejável para a absorção de substâncias e medicamentos, uma vez que a permeabilidade é um fator importante na disponibilidade oral e eficácia de um composto.

O teste de mutagenicidade *Ames*, também conhecido como teste de toxicidade *Ames*, é um método utilizado para avaliar o potencial mutagênico de substâncias

químicas (YANG *et al.*, 2019). Esse teste é baseado no uso de bactérias especializadas que possuem uma deficiência genética específica e são incapazes de sintetizar um nutriente essencial para seu crescimento. A mutagenicidade é uma característica indesejada de substâncias químicas, pois está relacionada à capacidade dessas substâncias de causar danos ao material genético das células, podendo levar ao desenvolvimento de câncer ou outras doenças genéticas. Os resultados indicam que o composto *strictosidine* apresentou uma mutagenicidade moderada, com um valor de 0,54. O composto *isovincoside* também mostrou uma mutagenicidade moderada, com um valor de 0,48. Já o composto *bannucine* apresentou uma baixa mutagenicidade, com um valor de 0,04. Dados na literatura informam que quanto menor for o valor relacionado ao teste de mutagenicidade menos toxidade o composto apresentará.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da análise computacional *in silico* foi possível simular o processo de ancoragem molecular de ligantes derivados *Catharanthus roseus* no sítio ativo M^{PRO} e *Spike* do coronavírus. As energias livres de *Gibbs* de ligação, assim como as constantes de inibição enzimática de cada sistema complexo formado foram estimadas e destacados os melhores ligantes a saber: *strictosidine*, *isovincoside* e *bannucine* em termos de estabilidade termodinâmica. Em termos gerais, estes ligantes são satisfatórios em relação aos testes de *ADMET*.

Estes relatos científicos predizem, portanto, uma possível eficácia em termos de inibição enzimática das proteínas investigadas contribuindo assim, para a prospecção de novos fármacos anti-COVID-19. O elucidado nesta pesquisa corrobora fortemente para novas investigações em caráter *in vitro* e *in vivo* em prol de novos medicamentos no combate a COVID-19.

7. REFERÊNCIAS

- ALENCAR, V. S. Prospecção *in silico* de novos fármacos derivados da *Catharanthus roseus* no combate a covid-19: simulações de ancoragem molecular e previsões ADMET. TCC (Monografia Licenciatura em Química) **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA**, Bacabal, 2022.
- ALONSO, W. J.; SCHUCK-PAIM, C.; RIBAS FREITAS, A. R.; KUPEK, E.; WUERZIUS, C. R.; NEGRO-CALDUCH, E.; FERNANDES, R. M.; CRISTO, E. B.; VEIGA, A. B. G.; GIGLIO, R.; ABRAO, M. S.; PINHEIRO, S. F. Covid-19 em contexto: comparação com a mortalidade mensal por causas respiratórias nos estados brasileiros. *InterAmerican Journal of Medicine and Health*, [S. l.], v. 3, p. 1–21, 2020.
- ANTOUN, M.D.; MARTINEZ, E.; CABALLERO, R.; OQUENDO, I.; PROCTOR, G.R.; WEISLOW, O.S.; MCCLOUD T.G.; KISER, R.; STALEY, P.; & CLANTON, D. Evaluation of the Flora of Puerto Rico for In vitro Cytotoxic and Anti-HIV Activities, **Int. J Pharmacog**, v.37, n.4, p. 277-280, 2008.
- BERMAN, H. M.; BATTISTUZ, T.; BHAT, T. N.; BLUHM, W. F.; BOURNE, P. E.; BURKHARDT, K.; FENG, Z.; GILLILAND, G. L.; IYPE, L.; JAIN, S.; FAGAN, P.; MARVIN, J.; PADILLA, D.; RAVICHANDRAN, V.; SCHNEIDER, B.; THANKI, N.; WEISSIG, H.; WESTBROOK, J. D.; ZARDECKI, C. The Protein Data Bank, **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- CLARK, D. E.; PICKETT, S. D. Computational methods for the prediction of 'drug-likeness'. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 49-58, 2000.
- COSTA, A. N.; SÁ, É. R. A.; BEZERRA, R. D. S.; SOUZA, J. L.; LIMA, F. C. A. Constituents of buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) like inhibitors of the SARS-Coronavirus main peptidase: an investigation by docking and molecular dynamics. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, p. 4610-4617, 2021.
- DING, X. M.; HU, X. Y.; CHEN, Y.; XIE, J. H.; YING, M. X.; WANG, Y. D.; YU, Q. Differentiated Caco-2 cell models in food-intestine interaction study: Current applications and future trends, **Trends in Food Science & Technology**, v. 107, p. 455-465, 2021.
- DROSTEN, C.; GÜNTHER, S.; PREISER, W.; VAN DER WERF, S.; BRODT, H.-R.; BECKER, S.; RABENAU, H.; PANNING, M.; KOLESNIKOVA, L.; FOUCHIER, R. A. M.; BERGER, A.; BURGUIÈRE, A.-M.; CINATL, J.; EICKMANN, M.; ESCRIOU, N.; GRYWNA, K.; KRAMME, S.; MANUGUERRA, J.-C.; MÜLLER, S.; RICKERTS, V.; STÜRMER, M.; VIETH, S.; KLENK, H.-D.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; SCHMITZ, H.; DOERR, H. W. Identification of a Novel Coronavirus in Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome, **N Engl J Med**, v. 348, p. 1967-1976, 2003.

ENMOZHI, S. K.; RAJA, K.; SEBASTINE, I.; JOSEPH, J. Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an *in silico* approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 9, p. 3092-3098, 2021.

FALCÃO, M. A. Estudo de extração de *C. roseus* e produção de nanopartículas para liberação de vimblastina. Tese (doutorado em engenharia e tecnologia de materiais) - **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia**. Porto Alegre, p. 17, 2016.

FERRAZ, L. G. W. Vacinas à base de subunidade proteica para prevenção da COVID-19: Mecanismo de ação, ensaios clínicos e pedidos de patentes. **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**. 2021. Disponível em <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/patentes/tecnologias-para-covid-19/Arquivos%20Textos/estudo10-de-vacinas-suunidade_03052021.pdf> acesso em 05 de março de 2023.

FERREIRA, D. C. S. Atividade Inibidora enzimática de derivados da *Catharanthus roseus* em relação a M^{PRO} do novo coronavírus: simulações de ancoragem molecular e previsões ADMET. TCC (Monografia Licenciatura em Química) **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA**, Bacabal, 2022.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, p. 3219-3288, 1980.

GERALDO, A. P. F.; GERALDO, E. F.; GERALDO, T. F.; MARCELINO, T. P.; DE OLIVEIRA, F. S. L. *Catharanthus roseus*: ornamental e curativa: *Catharanthus roseus*: ornamental and healing. **Journal Archives of Health**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 243–248, 2022.

GOMES, A. F. T., Estudo *In silico* De Alvos Terapêuticos No Tratamento Do Diabetes Mellitus. Tese (Mestrado em Nutrição), **Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN**, [S. l.], p. 27, 2023.

GOODSELL, D. S. Computational docking of biomolecular complexes with *AutoDock*, in: E. A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), Protein-Protein Interact. a Mol. Cloning Man., Second, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York. [S. l.], p. 885–892. 2005.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, p.1-9, 1996.

GURUNG, A. B.; ALI, M. A.; LEE, J.; FARAH, M. A.; AL-ANAZI, K. M., Unravelling lead antiviral phytochemicals for the inhibition of SARS-CoV-2 M^{PRO} enzyme through *in silico* approach. **Life sciences**, v. 255, p. 117831, 2020.

HANAI T. Quantitative in silico analysis of SARS-CoV-2 S-RBD omicron mutant transmissibility. **Talanta. J. Talanta**. v. 240, p. 123206, 2022.

HUANG, Y.; YANG, C.; XU, X.-F.; XU, W.; LIU, S.-W., Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacol Sin**, v. 41, p. 1141–1149, 2020.

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.; YOU, T.; LIU, X.; YANG, 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 M^{PRO} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, p. 289-293, 2020.

KADAN, R.U., ROY, N. Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of In Silico Methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, n. 5, p. 609-615, 2007.

KAR, S.; ROY, K.; LESZCZYNSKI, J., Applicability Domain: A Step Toward Confident Predictions and Decidability for QSAR Modeling. **Computational Toxicology**, v. 1800, 2018.

KIM, S.; THIESSEN, P. A.; BOLTON, E. E.; CHEN, J.; FU, G.; GINDULYTE, A.; HAN, L.; HE, J.; HE, S.; SHOEMAKER, B. A.; WANG, J.; YU, B.; ZHANG, J.; BRYANT, S. H., *PubChem* Substance and Compound databases, **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 1202–1213, 2016.

KIRCHDOERFER, R. N.; WARD, A. B. Structure of the SARS-CoV *nsp12* polymerase bound to *nsp7* and *nsp8* co-factors. **Nature Commun**, v. 10, p. 2342, 2019.

KUMAR, N. Van der Waals semiconductor embedded transparent photovoltaic for broadband optoelectronics. **ScienceDirect**, v. 34, [S. n.] 2022.

KUMAR, S.; SINGH, B.; SINGH, R. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: A review of its ethnobotany, phytochemistry, ethnopharmacology and toxicities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 284, p. 114647, 2022.

LANA, R. M.; COELHO, F. C.; GOMES, M. F. C.; CRUZ, O. G.; BASTOS, L. S.; VILLELA, D. A. M.; CODEÇO, C. T. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, 2020.

LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 2778-2786, 2011.

LEMOES, P.; FILHO, N. A.; FIRMO, J. COVID-19, desastre do sistema de saúde no presente e tragédia da economia em um futuro bem próximo. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 2, n. 4, p. 39–50, 2020.

LI, W., Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, p. 450–454, 2003.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

MA, X.; CHEN, C.; YANG, J. Predictive model of blood-brain barrier penetration of organic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 500–512, 2005.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. **UNINGÁ Review**, v.24, n. 1, p. 56-61, 2015.

MISHRA, D.; MAURYA, R. R.; KUMAR, K.; MUNJAL, N. S.; BAHADUR, V.; SHARMA, S.; SINGH, P.; BAHADUR, I., Structurally modified compounds of *hydroxychloroquine*, remdesivir and *tetrahydrocannabinol* against *main protease* of SARS-CoV-2, a possible hope for COVID-19: Docking and molecular dynamics simulation studies. **Journal of molecular liquids**, v. 335, p. 116185, 2021.

MISHRA, J. N.; VERMA, N. K. A brief study on *Catharanthus roseus*: A review. **International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 20-23, 2017.

MONNERAT, C. S. Bioprodução de *Ajmalicina* em *Catharanthus roseus* inoculadas com micorrizas arbusculares e adubadas com nitrogênio e fósforo. Tese (doutorado em Ciências Naturais) - **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF**. Campos dos Goytacazes, p. 14, 2011.

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 Computational Chemistry**, v. 19, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational chemistry**, v. 28, p. 1145-1652, 2007.

OLIVEIRA, B. G.; SANTOS, I. T. O. REGO, D. G., A regra de Bent contextualiza a força da ligação de hidrogênio em clusters trimoleculares. **Química Nova**, v. 35, 2012. Disponível em: https://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=75. Acesso em 30 de mai. 2023.

PARANHOS, C. A. M., Estudos *in silico* de potenciais inibidores da enzima *histona deacetilase*. Tese (mestrado em Química) - **Universidade Estadual de Santa Cruz**, p. 10, 2015.

PRASANTH, D. S. N. B. K.; MANIKANTA, M.; CHANDRAMOHAN, V.; BHAVYA, G.; LAKSHMANA RAO, A.; PANDA, S. P.; RAO, G. S. N. K.; CHAKRAVARTHI, G.; TEJA, N.; SUGUNA RANI, P.; ASHU, G.; PURNADURGANJALI, C.; AKHIL, P.; VEDITA BHAVANI, G.; JASWITHA, T., -silico strategies of some selected phytoconstituents from *Melissa officinalis* as SARS CoV-2 *main protease* and *spike protein* (COVID-19) inhibitors **Molecular Simulation**, v. 47, p. 457-470, 2021.

RAMOS, R. M.; PEREZ, J. M.; BAPTISTA, L. A.; AMORIM, H. L. N. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from

Mycobacterium tuberculosis with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal Molecular Modeling**, v. 18, p. 4013-4024, 2012.

SÁ, É. R. A.; COSTA, A. N.; COSTA, R. K. M.; SOUZA, J. L.; RAMOS, R. M.; LIMA, F. D. C. A., In silico study of the interactions of *Pilocarpus microphyllus* imidazolic alkaloids with the *main protease* (MPRO) of SARS-CoV-2, **Molecular Simulation**, v. 47, p. 74-87, 2021.

SANTOS, H. L., Docagem molecular: em busca do encaixe perfeito e acessível, **BIOINFO – Revista Brasileira de Bioinformática**, v. 1, [S. n.] 2021.

SILVA, J. D. de S.; LEITE, S. da C.; SILVA, M. T. S. da; MEIRELLES, L. M. A.; ANDRADE, A. W. L. In silico evaluation of the inhibitory effect of antiretrovirals *Atazanavir* and *Darunavir* on the *main protease* of SARS-CoV-2: docking studies and molecular dynamics. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. e826986562, 2020.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J.-B. Minimization by Random Search Techniques. **Mathematics Operations Research**, v. 6, p. 19-30, 1981.

SOUSA, C. D. F.; PAIVA, J. P. S.; LEAL, T. C.; SILVA, L. F.; SANTOS, L. G., Evolução espaço temporal da letalidade por COVID-19 no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 4, 2020.

SOUZA, J. L.; LIMA, F. C. A.; CRUZ, J. V.; ALMEIDA, T. R.; SILVA, C. B. B. In silico study of alkaloids derived from *Catharanthus roseus* in the active site of *Trypanosoma cruzi* by molecular docking. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. e23711528114, 2022.

SOUZA, R. L. Aplicação da técnica de ancoragem molecular na otimização do fármaco hipoglicemiante metformina. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia). **Centro Universitário Luterano de Palmas**, Palmas, Tocantins, 2015. Disponível em: <<http://ulbra-to.br/bibliotecadigital/publico/home/documento/169>>. Acesso em: 11 jun. 2023

TAVARES, M. T.; PRIMI, M. C.; POLLI, M. C.; FERREIRA, E. I.; PARISE-FILHO, R., interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química Nova**, v. 38, 2015.

ULLRICH, S.; NITSCHKE, C., The SARS-CoV-2 *main protease* as drug target. **Bioorganic & medicinal chemistry letters** v. 30, n. 17, 2020.

VOLLHARDT, K.; PETER C.; SCHORE, N. E. Química orgânica: estrutura e função. 4.ed. Porto Alegre: **Bookman**, 2004.

WADAPURKAR, R. M.; SHILPA, M. D.; KATTI, A. K. S.; SULOCHANA, M. B. In silico drug design for *Staphylococcus aureus* and development of host-pathogen interaction network. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 10, p. 58-70, 2018.

WAHAB, N. Z. A., AZIZUL, A.; IBRAHIM, N. Phytochemistry, cytotoxicity and antiviral activity of *Catharanthus roseus*. **Iranian journal of microbiology**, v. 12, n. 5, p. 460-465, 2020.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. *LIGPLOT*: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions Get access Arrow. **Journal Article**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

WANG, M. Y., ZHAO, R., GAO, L. J., GAO, X. F., WANG, D. P., & CAO, J. M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.

WHO - World Health Organization, Brasil: WHO Coronavirus Disease (COVID-19) **Dashboard With Vaccination Data**. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 29 mai. 2023.

XIONG, G.; WU, Z.; YI, J.; FU, L.; YANG, Z.; HSIEH, C.; YIN, M.; ZENG, X.; WU, C.; LU, A.; CHEN, X.; HOU, T.; CAO, D. *ADMETlab 2.0*: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W5-W14, 2021.

YANG, H.; ZHANG, X.; LIU, H.; CUI, W.; ZHANG, Q.; LI, Y.; YU Z.; JIA, X. *Lanthanum nitrate* genotoxicity evaluation: Ames test, mouse micronucleus assay, and chromosome aberration test. **Mutat Res.** v.1, n.810, p.1-5, 2016.

YAZDANIAN, M.; GLYNN, S. L.; WRIGHT, J. L.; HAWI, A. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1490–1494, 1998.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man--fact or myth. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 6, p. 763–766, 1997.