

Expansão do conhecimento e
inovação tecnológica no campo
das ciências farmacêuticas



Débora Luana Ribeiro Pessoa
(Organizadora)

Atena
Editora
Ano 2021

3

Expansão do conhecimento e
inovação tecnológica no campo
das ciências farmacêuticas



Débora Luana Ribeiro Pessoa
(Organizadora)

3

Atena
Editora
Ano 2021

4-TERPINEOL (-)4TRP COMO CANDIDATO A FÁRMACO PARA COVID-19

Data de aceite: 01/09/2021

Data de submissão: 04/06/2021

Luana Camilla Cordeiro Braz

Instituto Federal da Paraíba, campus
Esperança.
Esperança – Paraíba
<http://lattes.cnpq.br/9070096764049401>

Liliane Karine Cordeiro Braz

Universidade Federal de Campina Grande,
CCBS.
Campina Grande – Paraíba
<http://lattes.cnpq.br/3501848203418056>

Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

Universidade Federal de Campina Grande,
CDSA.
Sumé – Paraíba
<http://lattes.cnpq.br/6567428409599611>

Rafael Trindade Maia

Universidade Federal de Campina Grande,
CDSA.
Sumé – Paraíba
<http://lattes.cnpq.br/2415016408445222>

RESUMO: No final de 2019, um novo coronavírus (SARS-CoV-2) surgiu na China causando a maior pandemia viral dos últimos tempos. A inexistência de medicamentos específicos ocasionou uma incessante corrida para reposicionamento de fármacos no meio científico, para identificação de moléculas promissoras no tratamento da COVID-19. A

NSP9 é uma replicase que está associada a replicação viral do SARS-CoV-2 e, portanto, representa um importante alvo para compostos inibidores. O 4-terpineol é um monoterpeneo com inúmeras propriedades farmacológicas, entre elas atividade antimicrobiana e antiviral. O presente estudo adotou como objetivo fazer simulações de *docking* molecular entre a NSP9 e (-)-4-terpineol. As moléculas foram obtidas em base de dados públicas (PDB e ZINC). Foi utilizado o programa Autodocktools 1.5.6 para as simulações de *docking*, enquanto que as análises das interações e análise visual dos complexos foram realizados no programa DS-Discovery Studio. As energias de ligação obtidas tiveram valores negativos variando de -4.39 a -4.19 kcal/mol. O monoterpeneo interagiu com 8 aminoácidos do sítio catalítico da enzima, sendo a maioria hidrofóbicos. Ocorreu a formação de uma ligação de hidrogênio entre a ARG40 e o grupamento hidroxila do ligante. As outras interações foram representadas por ligações do tipo alquil e pi-alquil promovidas por três aminoácidos e interações de van der Waals com outros quatro aminoácidos. Estes resultados indicam uma afinidade entre o ligante e o sítio ativo da enzima. O 4-terpineol é um candidato interessante para ensaios *in vitro* e *in vivo* visando determinar o potencial de inibição viral do SARS-CoV-2.

PALAVRAS - CHAVE: Bioinformática estrutural e aplicada, Inibição viral, Modelagem molecular, Prospecção de fármacos.

TERPINEN-4-OL (-)4TRP AS A DRUG CANDIDATE FOR COVID-19

ABSTRACT: In late 2019, a new coronavirus (SARS-CoV-2) emerged in China causing the biggest viral pandemic in recent times. The inexistence of specific medications led to an incessant race for the repositioning of drugs in the scientific world, to identify promising molecules for the treatment of COVID-19. NSP9 is a replicase that is associated with viral replication of SARS-CoV-2 and therefore represents an important target for inhibitor compounds. Terpinen-4-ol is a monoterpene with numerous pharmacological properties, including antimicrobial and antiviral activities. The present study aimed to perform molecular docking simulations between NSP9 and (-)-terpinen-4-ol. The molecules were obtained from a public database (PDB and ZINC). The Autodocktools 1.5.6 program was used for the docking simulations, while the interaction analysis and visual analysis of the complexes were performed using the DS-Discovery Studio program. The binding energies obtained had negative values ranging from -4.39 to -4.19 kcal/mol. The monoterpene interacted with 8 amino acids from the enzyme's catalytic site, most of which were hydrophobic. A hydrogen bond was formed between the ARG40 and the hydroxyl group of the ligand. The other interactions were represented by alkyl and pi-alkyl bonds promoted by three amino acids and van der Waals interactions with four other amino acids. These results indicate an affinity between the ligand and the active site of the enzyme. Terpinen-4-ol is an interesting candidate for *in vitro* and *in vivo* assays to determine the potential for viral inhibition of SARS-CoV-2.

KEYWORDS: Structural and Applied Bioinformatics, Viral Inhibition, Molecular Modeling, Drug Prospecting.

1 | INTRODUÇÃO

No final de 2019, um novo coronavírus denominado como SARS-CoV-2 surgiu na cidade de Wuhan, China, e causou um surto de pneumonia viral incomum. A síndrome respiratória aguda grave causada por esse vírus altamente transmissível, conhecida como Doença do Coronavírus-2019 (COVID-19), rapidamente se espalhou por todo o mundo e, em 11 março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou a COVID-19 como uma pandemia (HU *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). Até o final de maio de 2021, foram registrados mais de 171 milhões casos e 3,5 milhões de mortes por COVID-19 (CORONAVÍRUS RESOURCE CENTER, 2021).

COVID-19 é, até o momento, a terceira doença humana altamente patogênica causada por coronavírus. Embora menos mortal do que SARS e MERS, a rápida propagação desta doença altamente contagiosa representou a ameaça mais severa para a saúde global neste século. O surto de SARS-CoV-2 já dura mais de um ano e é provável que este vírus emergente estabeleça um nicho em humanos e coexista conosco por muito tempo (HU *et al.*, 2020).

Compreender a virologia dos coronavírus, os métodos para controlar sua disseminação e dispor de tratamentos eficazes são tarefas necessárias para manter a saúde global e a estabilidade econômica. A inexistência de medicamentos específicos contra o

SARS-CoV-2 ocasionou uma incessante corrida no meio científico para reposicionamento de fármacos e identificação de moléculas promissoras no tratamento da COVID-19.

O tratamento de infecções causadas pelos coronavírus têm se concentrado nas seguintes estratégias terapêuticas: vacinação com a glicoproteína Spike presente no envelope do SARS-Cov-2 e direcionamento de pequenas moléculas inibidoras cujos alvos são enzimas virais conservadas (LITTLER *et al.*, 2020).

O genoma viral do SARS-CoV-2 codifica 29 proteínas, muitas das quais poderiam servir como alvos potenciais para drogas antivirais. Dentre essas proteínas, a proteína spike (S), as proteases C-like e as proteínas do nucleocapsídeo têm ganhado interesse crescente devido aos seus papéis relevantes no reconhecimento da célula hospedeira, replicação viral, processamento e formação da estrutura do nucleocapsídeo (HOLANDA *et al.*, 2021).

Adicionalmente, algumas proteínas não estruturais dos coronavírus parecem importantes para a replicação viral no SARS-CoV e influenciam sua patogênese. Considerando a homologia com SARS-CoV-2, essas proteínas não estruturais são alvos de interesse, devido às possíveis funções conservadas dentro do ciclo de reprodução viral. Dentre essas proteínas, a proteína NSP9 (do inglês *non structural protein 9*) presumidamente medeia a replicação viral e a virulência. Acredita-se que a NSP9 se liga ao RNA de uma forma exclusiva nos betacoronavírus, entretanto as bases moleculares precisam ser melhor elucidadas (LITTLER *et al.*, 2020).

De acordo com Sutton *et al.* (2004), a NSP9 possivelmente desempenha funções múltiplas no ciclo de replicação dos coronavírus, interagindo com outras proteínas para a formação do complexo de replicação viral. Dessa forma, a NSP9 é um importante alvo para a busca de candidatos a fármacos antivirais que atuem como inibidores da replicação do SARS-CoV-2.

Dentre os possíveis candidatos à fármaco, os terpenóides têm apresentado variadas propriedades farmacológicas. O monoterpeneo 4-terpineol (4TRP) é um metabólito secundário encontrado no óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel (TIGHE *et al.*, 2013), *Croton argyrophylloides* Muell Arg (MORAIS *et al.*, 2006) e *Alpinia zerumbet* “Variegata” (MACEDO *et al.*, 2013). O 4TRP tem diversas atividades farmacológicas demonstradas, incluindo atividade antimicrobiana (NINOMIYA *et al.*, 2013) e antiviral (GAROZZO *et al.*, 2009).

O presente estudo adotou como objetivo fazer simulações de *docking* molecular para prever a interação entre a proteína NSP9 e o monoterpeneo (-)-4-terpineol.

2 | METODOLOGIA

Para avaliação preliminar do potencial do 4-terpineol como candidato a fármaco como inibidor viral do SARS-CoV-2 foi utilizada uma abordagem *in silico* a partir de ensaios

de Docking Molecular. As estruturas do ligante e da proteína foram obtidas de bases de dados públicas.

A estrutura tridimensional (3D) do (-)-4-terpineol, (-)-4TRP, foi obtida na base de dados de pequenas moléculas, ZINC database (<https://zinc.docking.org/>), com o código de acesso ZINC04262096 (Figura 1).

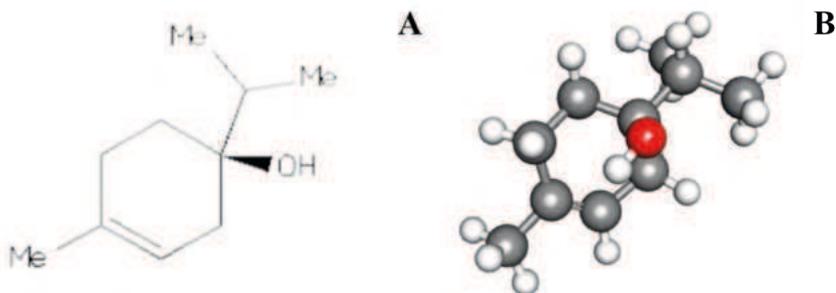


Figura 1. Visualização 2D (A) e 3D (B) do ligante (-)-4-terpineol.

A estrutura tridimensional da NSP9 (PDB ID: 6W4B) foi obtida no banco de dados PDB - *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), elucidada por meio de cristalografia de raios-X e apresentando uma resolução de 2.95 Å. (Figura 2).

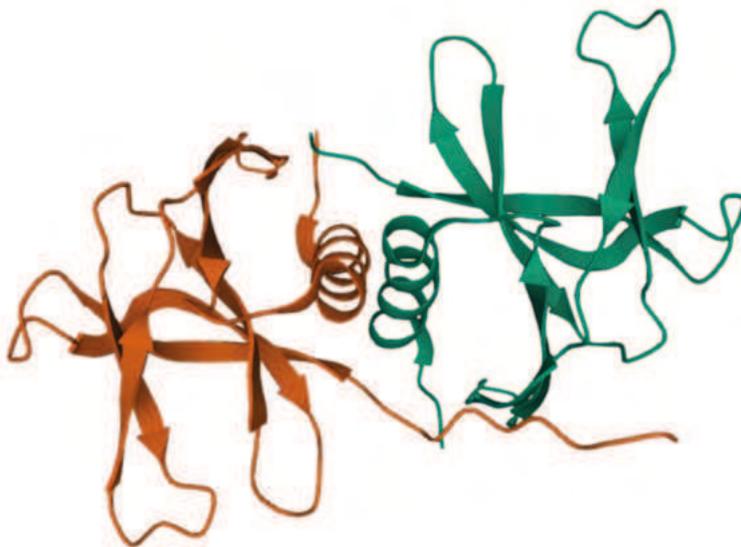


Figura 2. Estrutura do homodímero da proteína NSP9 do SARS-CoV-2 (PDB ID: 6W4B). As duas cadeias polipeptídicas estão representadas nas cores laranja e verde.

As simulações de *docking* proteína-ligante foram realizadas no programa Autodock Tools 1.5.6 (MORRIS *et al.*, 2009), por meio de *docking* semirrígido, no qual o receptor foi considerado na sua estrutura rígida e o ligante como flexível. O *grid* foi configurado para abranger o máximo de pontos (126x126x126) com cobertura da estrutura completa da proteína. Os cálculos realizados para *docking* e obtenção dos complexos com menor energia foram realizados por meio do Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) com os seguintes parâmetros: 10.000 réplicas, população de 150 indivíduos, 2.500.000 avaliações de energia, 27.000 gerações. As taxas de mutação e cruzamento foram respectivamente 0,02 e 0,8. Foram, então, gerados 10 melhores complexos e ordenados com base no ranking de menor energia. As estruturas tridimensionais (3D) dos complexos foram avaliadas no software Discovery Studio. Adicionalmente, os resíduos do sítio catalítico foram inferidos pelo programa GHECOM (<https://pdj.org/ghecom/>) (KAWABATA, 2010).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 10 complexos gerados pelo *docking* molecular apresentaram energias de ligação com valores negativos variando de -4.39 a -4.19 kcal/mol. A partir de tais valores negativos é possível inferir que é termodinamicamente favorável a existência das moléculas formando um complexo. Os resultados de energias de ligação e constantes de inibição (K_i) para as cinco melhores conformações estão mostrados na Tabela 1. A visualização 3D do complexo de menor energia no software Discovery Studio está mostrada na Figura 3.

Complexo	Energia livre de ligação	Energia intermolecular	K _i	Pontes de hidrogênio
1	-4,43 kcal/mol	-5,03 kcal/mol	566,8 µM	A:ARG40:O - <O> H18
2	-4,39 kcal/mol	-4,99 kcal/mol	600,41 µM	-
3	-4,37 kcal/mol	-4,96 kcal/mol	628,14 µM	A:ARG40:O - <O> H18
4	-4,28 kcal/mol	-4,87 kcal/mol	733,9 µM	A:ARG40:O - <O> H18
5	-4,28 kcal/mol	-4,87 kcal/mol	732,38 µM	A:ARG40:O - <O> H18

Tabela 1. Resultado dos cinco melhores complexos do (-)4TRP com a NSP9.

O monoterpene (-)4TRP interagiu com oito aminoácidos do sítio catalítico da enzima, sendo a maioria hidrofóbicos (Figura 4). Ocorreu a formação de uma ligação de hidrogênio entre o resíduo ARG40 e o grupamento hidroxila do ligante (-)4TRP. As outras interações foram representadas por ligações do tipo alquil e pi-alquil promovidas por três resíduos (PHE57, ILE66 e VAL42) e interações de van der Waals com outros quatro resíduos (PRO58, LYS59, THR68 e PHE41). O putativo sítio de ligação do (-)4TRP faz parte do sítio catalítico predito para a NSP9 pelo programa GHECOM, conforme mostrado na Figura 5.

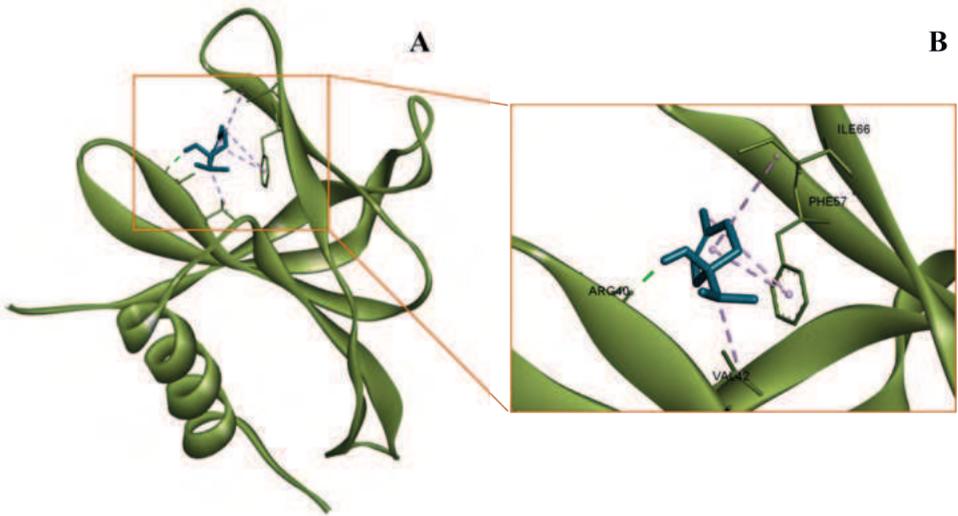


Figura 3. Representação do sítio catalítico da NSP9 com o ligante (-)4TRP visualizado no Discovery Studio. Representados em verde estão a cadeia A da NSP9 e os resíduos de ancoragem e representado em azul, o ligante (-)4TRP.

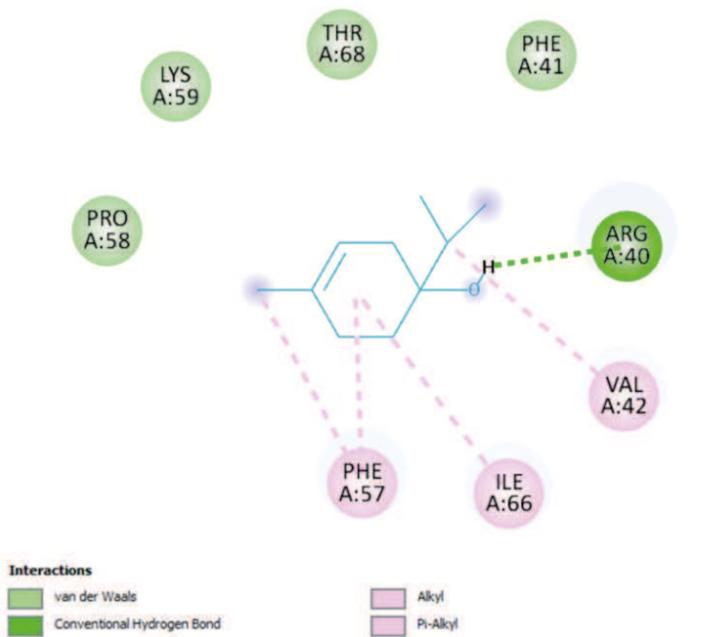


Figura 4. Diagrama 2D representando as interações entre o (-)4TRP e os resíduos da NSP9 obtido no software Discovery Studio.

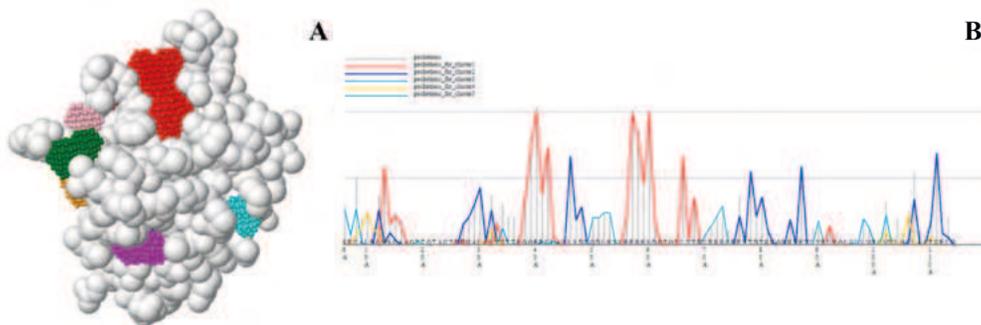


Figura 5. Representação 3D (A) e gráfica (B) dos sítios ativos preditos pelo programa GHECOM. Observa-se que os resíduos que interagiram com o ligante (-)4TRP nas simulações de docking encontram-se no cluster 1, representado em vermelho.

Estes resultados indicam uma afinidade entre o (-)4TRP e o sítio catalítico na NSP9, sugerindo que esse monoterpene possa atuar como um possível inibidor dessa enzima. Resultados semelhantes foram obtidos por Maia *et al.* (2020) em ensaios de *docking* molecular com o monoterpene mentol e a NSP9 cujas energias de ligação variaram entre -5,05 kcal/mol a -4,22 kcal/mol.

4 | CONCLUSÃO

O monoterpene 4-terpineol é um candidato interessante para realização de outros ensaios *in silico*, além de ensaios *in vitro* e *in vivo*, visando determinar o potencial de inibição viral do SARS-CoV-2. Vale ressaltar que esses ensaios são necessários antes de qualquer possibilidade de uso medicamentoso do 4-terpineol para tratamento específico da COVID-19.

REFERÊNCIAS

CORONAVÍRUS RESOURCE CENTER. COVID-19 Map, 2021. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 31 maio 2021.

GAROZZO, A.; TIMPANARO, R.; BISIGNANO, B.; FURNERI, P.M.; BISIGNANO, G.; CASTRO, A. In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 49, n.6, p 806-808, 2009.

HOLANDA, V.N.; LIMA, E.M.A.; SILVA, W.V.D.; MAIA, R.T.; MEDEIROS, R.L.; GHOSH, A.; LIMA, V.L.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Identification of 1,2,3-triazole-phthalimide derivatives as potential drugs against COVID-19: a virtual screening, docking and molecular dynamic study. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, [publicado online], p. 1-19, 2021.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.19, n. 3, p.141-154, 2021.

KAWABATA, T. Detection of multi-scale pockets on protein surfaces using mathematical morphology. **Proteins**, v. 78, n. 5, p. 1195-1121, 2010.

LITTLER, D.R.; GULLY, B.S.; COLSON, R.N.; ROSSJOHN, J. Crystal Structure of the SARS-CoV-2 Non-structural Protein 9, Nsp9, **iScience**, v. 23, n. 7, 2020.

MACEDO, I. T. F.; OLIVEIRA, M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; RIBEIRO, W.L.C.; SANTOS, J.M.L.; MORAIS, S.M.; PAULA, H.C.B.; BEVILAQUA, C.M.L. In vitro effects of *Coriandrum sativum*, *Tagetes minuta*, *Alpinia zerumbet* and *Lantana camara* essential oils on *Haemonchus contortus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 4, p. 463-469, 2013.

MAIA, R.T.; MEDEIROS, R.L. ; BRAZ, L.C.C. ; ARAÚJO, B.M.R.; COELHO, G.D.; NÓBREGA, F.F.F. Docking molecular evidencia o mentol como potencial inibidor de uma proteína de replicação viral (NSP9) SARS-CoV-2. **Revista Plantão**, v. 1, p. 21-23, 2020.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORRIS, G.M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M.F.; BELEW, R.K.; GOODSSELL, D.S.; OLSON, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J. Comput. Chem.**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

NINOMIYA, K.; HAYAMA, K.; ISHIJIMA, S.; TAKAHASHI, M.; KURIHARA, J.; ABE S. Effects of Inhibitory Activity on Mycelial Growth of *Candida albicans* and Therapy for Murine Oral Candidiasis by the Combined Use of Terpinen-4-ol and a Middle-chain Fatty Acid, Capric Acid. **Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 133, n. 1, p. 133-140, 2013.

SUTTON, G.; FRY, E.; CARTER, L.; SAINSBURY, S.; WALTER, T.; NETTLESHIP, J.; BERROW, N.; OWENS, R.; GILBERT, R.; DAVIDSON, A.; SIDDELL, S.; POON, L.L.; DIPROSE, J.; ALDERTON, D.; WALSH, M.; GRIMES, J.M.; STUART, D.I. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. **Structure**, v. 12, n. 2, p. 341-53, 2004.

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. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 10, 587269, 2020.