



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



JOYCE HELENA CUNHA E SILVA

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE TIAZOIS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA
PROTEÍNA N DO VÍRUS SARS-CoV-2

MACAÉ, RJ - BRASIL
2021

JOYCE HELENA CUNHA E SILVA

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DE TIAZOIS COMO POTENCIAIS INIBIDORES DA
PROTEÍNA N DO VÍRUS SARS-CoV-2

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Curso de
Farmácia da Universidade
Federal do Rio de Janeiro –
Campus UFRJ-Macaé Prof.
Aloísio Teixeira como um dos
requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Diego Fernando da Silva Paschoal

Coorientador: Vinicius Schmitz Pereira Nunes

MACAÉ – RJ, BRASIL
2021

CC972a Cunha e Silva, Joyce Helena
Avaliação in silico de tiazóis como potenciais
inibidores da proteína N do vírus SARS-CoV-2 / Joyce
Helena Cunha e Silva. -- Rio de Janeiro, 2021.
66 f.

Orientador: Diego Fernando da Silva Paschoal.
Coorientador: Vinicius Schmitz Pereira Nunes.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus
Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em
Farmácia, 2021.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Proteína N. 4.
Docking Molecular. 5. Nitazoxanida e Tiazóis. I.
Paschoal, Diego Fernando da Silva, orient. II.
Nunes, Vinicius Schmitz Pereira, coorient. III.
Título.

Joyce Helena Cunha e Silva

Avaliação *in silico* de tiazóis como potenciais inibidores da proteína N do vírus SARS-CoV-2

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para obtenção do grau de farmacêutico.

Macaé, 29 de março de 2021.

Comissão avaliadora:

Prof. Dr. Diego Fernando da Silva Paschoal (Presidente da Banca)

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/2814348897103695>

Profa. Dra. Paula Alvarez Abreu

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/1275935652105959>

Prof. Dr. Willian Tássio Gomes Novato

UFRJ/Campus Macaé

<http://lattes.cnpq.br/7402297829650438>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me concedido a graça de estar me formando em uma das principais universidades do país, pela minha vida e saúde, e pela vida e saúde de todos os que contribuíram para a minha formação, direta ou indiretamente.

Agradeço aos meus pais, Moacir e Helena, por sempre me encorajarem a buscar meus sonhos, por terem me dado todo o suporte ao longo do curso, por sempre terem acreditado em mim e me estimulado a buscar meus sonhos.

Agradeço a minha irmã, Sheila, e minha sobrinha, Kayla, por todo apoio que me deram durante toda a faculdade.

Agradeço ao meu orientador, Diego Paschoal, por toda paciência e compreensão que teve comigo em alguns momentos, por todo suporte e auxílio, pelos conselhos e por todos os ensinamentos passados ao longo da nossa trajetória no Núcleo de Química Teórica e Computacional de Macaé (NQTCM).

Sou grata aos amigos que conquistei ao longo da graduação, em especial a Suzan Hanai, que sempre esteve presente em todos os momentos nos últimos cinco anos.

Agradeço também ao meu namorado, Jordan, que foi crucial nessa reta final ao me recordar dos meus objetivos, me apoiar e me encorajar a concluir mais essa etapa na minha vida, e pela sua companhia diária, tornando tudo mais leve.

Agradeço a minha fiel companheira, Miau, por me acompanhar nas noites viradas em cima dos livros estudando, por sempre estar ao meu lado e por todo amor e carinho que um bichinho de estimação pode ter com o seu tutor.

Sou grata aos meus professores da graduação que, com toda a competência, me ensinaram todas as bases dessa ciência tão majestosa que escolhi seguir como profissão.

A todos, o meu muito obrigado.

“Muitos medos vão tentar te segurar
Muitas vozes vão dizer que não vai dar
Sempre persista, não importa o que vão dizer
Só nunca desista do sonho que existe em você
Então mire as estrelas e salte o mais alto que der”

Bruno Faglioni

RESUMO

Desde que a pandemia da COVID-19 foi declarada no início do ano de 2020, o mundo se virou para uma intensa busca por uma vacina ou fármaco que atuasse no tratamento da COVID-19. Apesar de várias vacinas já terem sido aprovadas para uso, a busca por um fármaco que atue no tratamento da COVID-19 é de fundamental importância, uma vez que são tratamentos que atuam de forma conjunta no combate a doenças. Nessa busca por fármacos, o medicamento nitazoxanida (NTZ), um tiazol, apresentou atividade biológica contra o vírus SARS-CoV-2. Assim, o presente trabalho apresenta um estudo de *docking* molecular visando avaliar o perfil interação da NTZ e de outros tiazóis encontrados na literatura, com algum perfil de atividade biológica contra vírus, bactérias e outros agentes infectantes, com a proteína de N de SARS-CoV-2, construída através de modelagem molecular por homologia. Além disso, os perfis farmacocinético e toxicológico dos compostos selecionados também foram avaliados *in silico* através dos servidores OSIRIS Property Explorer e pkCSM – pharmacokinetics. Os resultados sugerem que 8 compostos apresentam um maior perfil de interação com a proteína N de SARS-CoV-2 que os compostos utilizados como referência, além de apresentarem um perfil ADMET adequado, sendo, portanto, compostos com potencial para terem sua resposta biológica avaliada contra o vírus SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, proteína N, docking molecular, nitazoxanida, tiazóis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Constituição do genoma da subfamília <i>Coronavirinae</i>	12
Figura 2 – Estrutura viral do SARS-CoV-2.....	13
Figura 3 – Ciclo de vida viral: Reprodução intracelular de partículas virais.....	14
Figura 4 – Estrutura 2D da cloroquina.....	17
Figura 5 – Estrutura 2D dos antivirais (a) lopinavir e (b) ritonavir.....	18
Figura 6 – Estrutura 2D do antiviral fapiravir.....	19
Figura 7 – Estrutura 2D da azitromicina.....	20
Figura 8 – Estrutura 2D da nitazoxanida.....	23
Figura 9 – Alinhamento das proteínas SARS-CoV (4KXJ), em verde, e SARS-CoV-2 (6VYO), em azul.....	43
Figura 10 – Gráfico de Ramachandran obtido na construção do modelo de proteína N de SARS-CoV-2.....	47
Figura 11 – Interação da nitazoxanida (NTZ) com a proteína N de SARS-CoV-2.....	48
Figura 12 – Interação do inibidor PJ34 e da nitazoxanida (NTZ) no sítio de ligação da proteína N. (a) Representação da superfície do sítio de ligação da proteína N no complexo PJ34@N-pro. (b) Mapa de interação 2D do inibidor PJ34 com a proteína N. (c) Representação da superfície do sítio de ligação da proteína N no complexo NTZ@N-pro. (d) Mapa de interação 2D da nitazoxanida com a proteína N.....	56
Figura 13 – Representação da superfície do sítio de ligação da proteína N com os 8 ligantes selecionados no estudo. As cores dos ligantes indicam: verde (ID 32), amarelo (ID 41), pink (ID 67), laranja (ID 68), rosa (ID 69), violeta (ID 81), azul (ID 84) e bege (ID 85).....	58
Figura 14 – Mapa de interação 2D dos ligantes selecionados após as análises realizadas com a proteína N de SARS-CoV-2.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tiazolídeos selecionados na literatura para o estudo de docking molecular.....	28
Tabela 2 – Afinidade de ligação (AL, kcal mol ⁻¹), em ordem decrescente de energia, obtida para interação ligante-proteína de cada um dos compostos estudados.....	48
Tabela 3 – Compostos selecionados após análise da afinidade de ligação para estudo das propriedades ADMET.....	49
Tabela 4 – Resultados das análises de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos 44 compostos selecionados utilizando o servidor pkCSM.....	52

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

2019-nCov – Novo coronavírus
SARS-CoV-2 - Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
COVID-19 - *Coronavirus disease 2019*
OMS – Organização Mundial da Saúde
SRAG - síndrome respiratória aguda grave
CoV – coronavírus
 α CoV – *Alphacoronavirus*
 β CoV – *Betacoronavirus*
 γ CoV – *Gammacoronavirus*
 δ CoV – *Deltacoronavirus*
SARS-CoV - Síndrome Respiratória Aguda Grave
MERS-CoV - Síndrome Respiratória do Oriente Médio
RNA + - RNA positivo
UTR – Região não traduzida
ORF – *Open Read Frame*
NSP - Proteína não estrutural
ECA2 – Enzima conversora de angiotensina 2
ATII - Células epiteliais alveolares do pulmão humano tipo II
RBD - Domínio de interação de receptores
RTC - Complexo de replicação-transcrição
TMPRSS2 – Protease transmembrana serina 2
NTD - Domínio de ligação RNA N-terminal
CTD - Domínio de dimerização C-terminal
LKR - Região de ligação mal estruturada
SRD - Domínio rico em serina/arginina
HBV – Vírus da hepatite B
HBC – Vírus da hepatite C
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LPV/r – lopinavir/ritonavir
GABA - ácido gama-aminobutírico

FDA - *Food and Drug Administration*

SBVS - Triagem virtual baseada em estrutura

LBVS - Triagem virtual baseada em ligante

MD – Dinâmica Molecular

PDB – *Protein Data Bank*

RMSD - *Root mean square deviation*

DOPE - *Discrete Optimized Potential Energy*

6VYO - Proteína N de SARS-CoV-2

NTZ – Nitazoxanida

OCT2 - Transportador de cátions orgânicos 2

ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PANDEMIA DA COVID-19.....	11
1.2 CORONAVÍRUS.....	12
1.3 TRATAMENTOS PROPOSTOS.....	16
1.3.1 Antimaláricos	17
1.3.2 Antivirais	18
1.3.3 Antibacterianos	20
1.3.4 Plasma Convalescente	21
1.3.5 Anti-helmínticos e Antiprotozoários	21
1.3.5.1 Ivermectina.....	21
1.3.5.2 Nitazoxanida.....	22
1.4 DOCKING MOLECULAR.....	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 JUSTIFICATIVA	27
4 METODOLOGIA	28
4.1 SELEÇÃO DOS LIGANTES.....	28
4.2 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES.....	42
4.2 MODELAGEM COMPARATIVA DA PROTEÍNA N.....	43
4.3 DOCKING MOLECULAR.....	44
4.4 PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO <i>IN SILICO</i>	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1 MODELAGEM COMPARATIVA DA PROTEÍNA N.....	46
5.2 ESTUDOS DE DOCKING MOLECULAR.....	46
5.3 ANÁLISE DO PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO.....	49
5.4 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES LIGANTE-PROTEÍNA.....	55
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 PANDEMIA DA COVID-19

Em dezembro de 2019, diversos casos de pneumonia de etiologia até então desconhecida começaram a ser relatados em Wuhan, província de Hubei, China. Após estudos, identificaram que o agente causador era uma nova espécie de vírus pertencente à família *Coronaviridae*, nomeado, inicialmente, como novo coronavírus (2019-nCov) (HELMY *et al.*, 2020; YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). Posteriormente, o novo vírus recebeu o nome de SARS-CoV-2 (coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave), e foi classificado como agente causador da Doença de Coronavírus 2019 - *Coronavirus disease 2019* - (COVID-19), declarada nos primeiros meses de 2020, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma pandemia, relatada em cerca de 200 países e territórios (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020).

A infecção é de transmissão humano-humano, através de gotículas de aerossol, contato direto, via fecal-oral e fômites compartilhados entre pacientes portadores da infecção e pessoas saudáveis (HELMY *et al.*, 2020).

A doença é caracterizada principalmente por sintomas respiratórios das vias superiores, além de febre, tosse seca, dispneia e diarreia em 20–25% dos pacientes. Outros sintomas observados foram cefaleia, tontura, fraqueza generalizada, vômitos, diarreia e sangramentos. Alguns casos mais graves da COVID-19 podem levar ao desenvolvimento de pneumonia grave, síndrome respiratória aguda grave (SRAG), acidose metabólica, choque séptico e falência múltipla de órgãos, sendo que estas complicações são mais comuns em idosos acima de 65 anos ou pessoas portadoras de comorbidades (CAO, 2020; HELMY *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020).

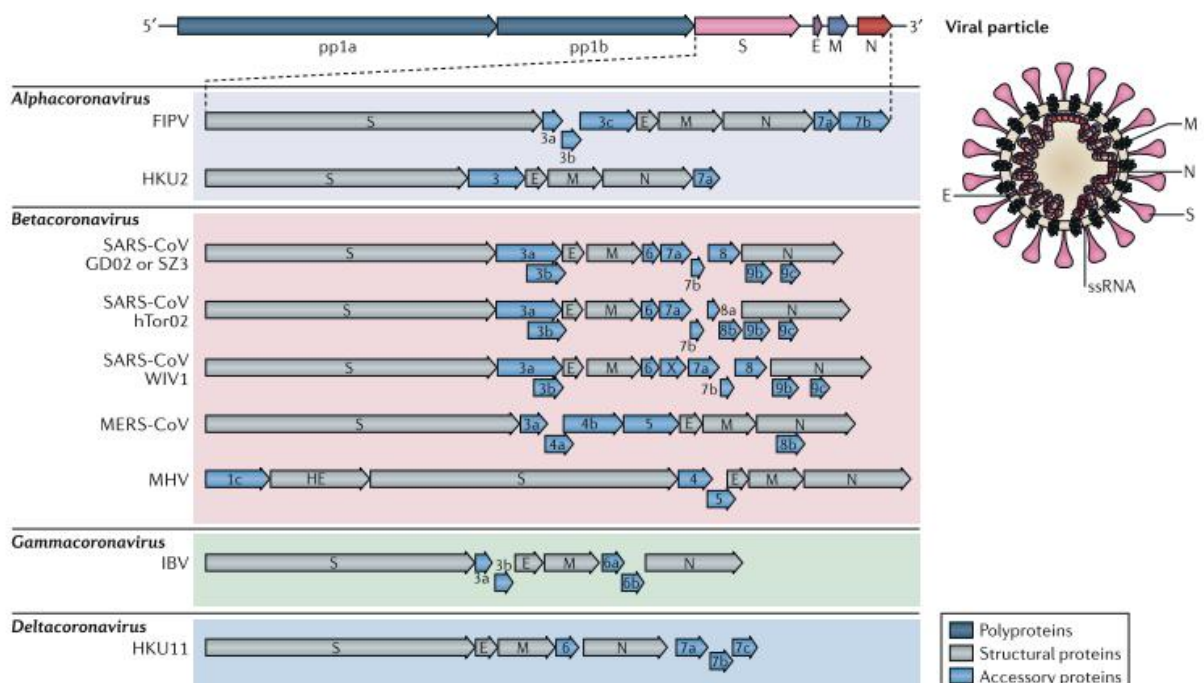
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021) até o início do mês de abril de 2021, aproximadamente um ano após a pandemia ter sido declarada, haviam registrados mais de 132 milhões de casos cumulativos de COVID-19 no mundo, com mais de 667 mil novos casos registrados em 24h, e um número superior a 2,8 milhões de mortes cumulativas em todo o mundo. Já no Brasil, o número total de casos ultrapassa os 13 milhões,

representando o 2º país com maior número de casos registrados, ficando atrás somente dos Estados Unidos (30,5 milhões de casos, aproximadamente). O país alcança a marca de mais de 4 mil mortes em 24h, num total superior a 300 mil mortes acumuladas em todo o território brasileiro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

1.2 CORONAVÍRUS

Os coronavírus (CoV) são vírus envelopados de material genético composto por RNA+ de fita simples, pertencentes à subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales* (CHAN *et al.*, 2020). São responsáveis por causar infecções respiratórias e intestinais em humanos e animais (CUI; LI; SHI, 2019). A subfamília *Coronavirinae* pode ser dividida em quatro gêneros (Figura 1): *Alphacoronavirus* (α CoV), *Betacoronavirus* (β CoV), *Gammacoronavirus* (γ CoV), e *Deltacoronavirus* (δ CoV) (CHAN *et al.*, 2020; HELMY *et al.*, 2020).

Figura 1 – Constituição do genoma da subfamília *Coronavirinae*

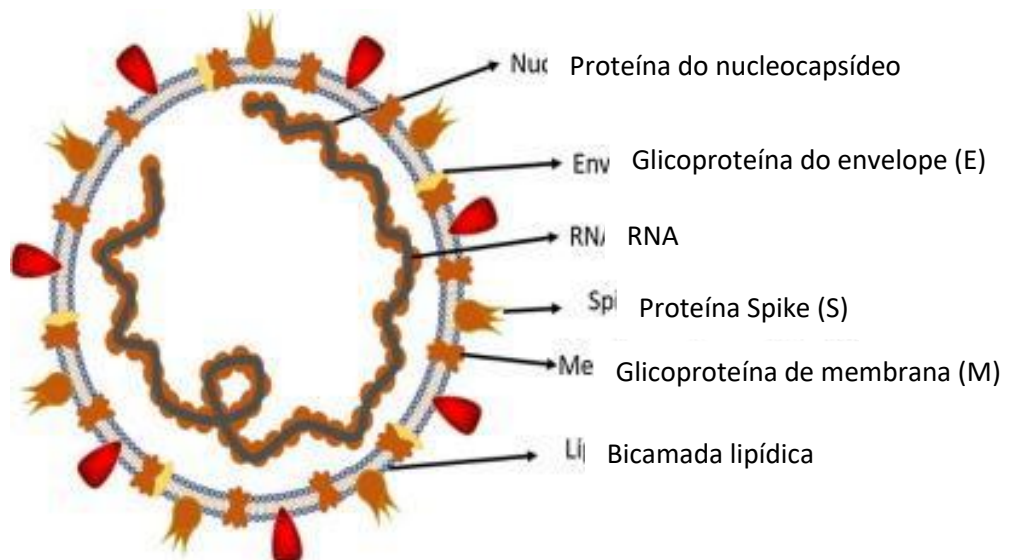


Fonte: (CUI, LI; SHI, 2019)

Os coronavírus α CoV e β CoV possuem potencial de infectar mamíferos, enquanto os γ CoV e δ CoV infectam aves. Já foram identificados seis coronavírus capazes de infectar humanos, entre eles α -CoVs HCoV-229E e HCoV-NL63 e β -CoVs HCoV-HKU1 e HCoV-OC43, que são de baixa patogenicidade e provocam apenas sintomas respiratórios leves semelhantes a um resfriado (GUO *et al.*, 2020). Os outros dois coronavírus conhecidos estão relacionados a duas outras grandes epidemias no passado. O primeiro, SARS-CoV, causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave, surgiu na China em 2002-2003 levando a um número aproximado de 8000 infecções e 800 mortes. O segundo, MERS-CoV, agente causador da Síndrome Respiratória do Oriente Médio, que desde 2012 é responsável por uma epidemia persistente na Península Arábica (CHAN *et al.*, 2020). Tanto o SARS-CoV quanto o MERS-CoV foram e são altamente patogênicos, apresentando 9,6% e 34,3% de taxa de letalidade, respectivamente (HELMY *et al.*, 2020).

No final do ano de 2019, o terceiro coronavírus altamente patogênico foi descoberto na China. O SARS-CoV-2 é pertencente ao gênero *Betacoronavirus* (β CoV), possuindo material genético composto por uma fita simples de RNA positivo (RNA+) (GUO *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020).

Figura 2 – Estrutura viral do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado (SHEREEN *et al.*, 2020)

O genoma do SARS-CoV-2 codifica cerca de 9000 aminoácidos. É composto por duas regiões não traduzidas (UTRs) e 11 fases de leitura aberta (ORFs – Open

Read Frame) responsável pela codificação de 27 proteínas. Aproximadamente dois terços do genoma viral é composto pela primeira ORF, que codifica proteínas não estruturais (NSPs). O restante do genoma codifica cerca de 6 proteínas acessórias e 4 proteínas estruturais. As proteínas virais estruturais são glicoproteína de pico (S) (*Spike*), proteína da matriz (M), proteína do envelope (E) e proteína do nucleocapsídeo (N), e as proteínas acessórias são orf3a, orf6, orf7a, orf7b, orf8 e orf10, responsáveis pela interferência na resposta imune inata do hospedeiro. De forma geral, o genoma do SARS-CoV-2 está organizado na ordem 5'-replicase (orf1 / ab) [Spike (S) – Envelope (E) - Membrana (M) - Nucleocapsídeo (N)] - 3' (CHAN *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2020; HELMY *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020; MONAJJEMI; MOLLAAMIN; SHOJAEI, 2020).

De forma geral, o ciclo de vida de um vírus no organismo hospedeiro consiste nas etapas de fixação, penetração, biossíntese, maturação e liberação. O vírus liga-se aos receptores de membrana da célula hospedeira e, por endocitose ou fusão de membranas, penetra no interior celular. O conteúdo viral é então liberado no citoplasma, e o RNA viral vai para o núcleo onde será replicado pela célula hospedeira para a produção de novas proteínas virais, que darão origem a novas partículas virais que, após maturação, serão liberadas da célula hospedeira (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020).

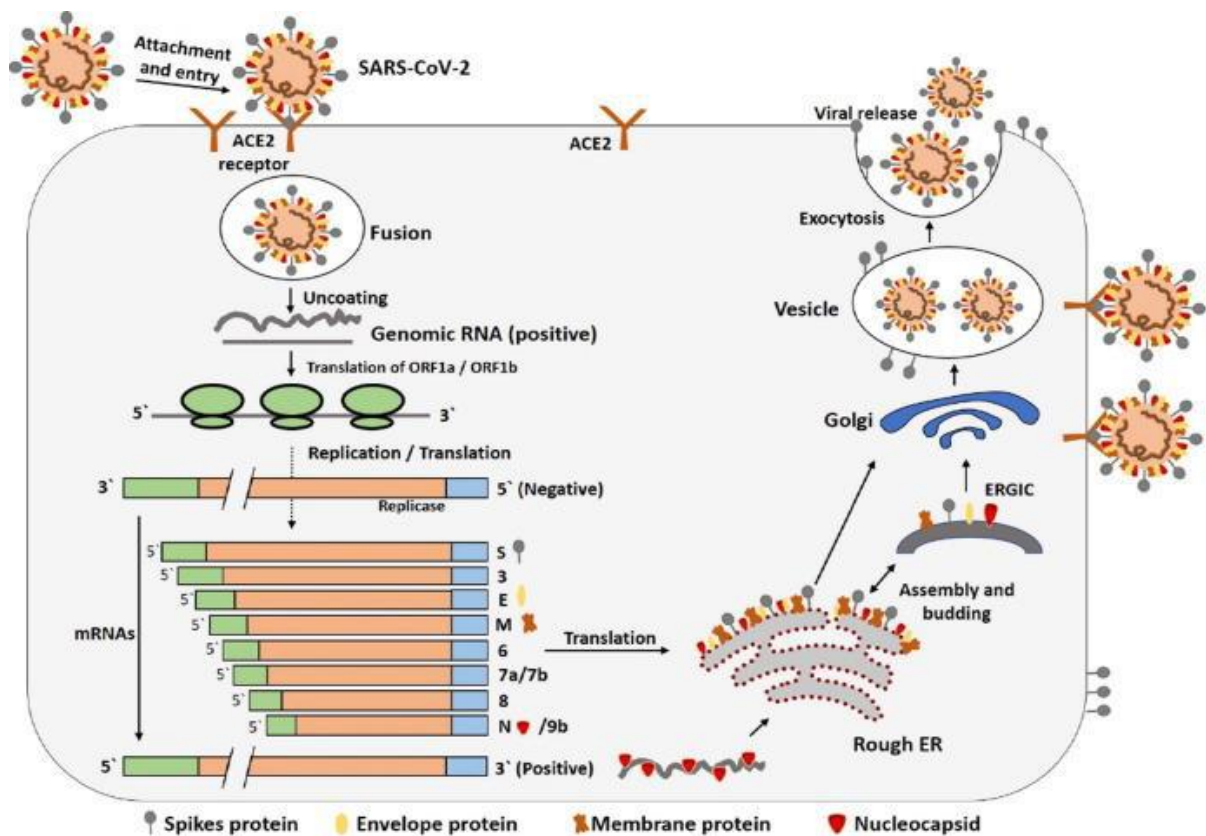
A infecção por SARS-CoV-2 é mediada pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), presente na superfície das células epiteliais alveolares do pulmão humano tipo II (ATII) (LIU *et al.*, 2020). A ECA2 funciona como receptor para a ligação da Glicoproteína S (*Spike*) do vírus. A glicoproteína S é formada por duas subunidades: subunidade S1, que contém um domínio de interação de receptores (RBD), responsável pela ligação ao receptor da célula hospedeira, e a subunidade S2, responsável pela fusão das membranas viral e hospedeira, possibilitando a internalização do vírus (LIU *et al.*, 2020; RAMESHRAD *et al.*, 2020; YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020).

Após a ligação do vírus na célula hospedeira, duas clivagens sequenciais via proteases acontecem para ativar a glicoproteína S: uma clivagem no local de clivagem S1 / S2 para iniciação e uma clivagem para ativação no local S'2. Após a última clivagem no local S'2 ocorre a sinalização para a fusão das membranas (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). O RNA viral é liberado no citoplasma após a

fusão das membranas. As poliproteínas pp1a e pp1ab são traduzidas e irão codificar proteínas estruturais para formar o complexo de replicação-transcrição (RTC), que dará origem a RNAs subgenômicos responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e acessórias. O RNA subgenômico recém formado, juntamente com proteínas do nucleocapsídeo e do envelope se reúnem no retículo endoplasmático e complexo de Golgi da célula hospedeira, e formam inúmeras partículas virais, que serão liberadas da célula hospedeira através de fusão de membranas (Figura 3) (GUO *et al.*, 2020).

A glicoproteína S do SARS-CoV-2 é incomum quando comparada as pertencentes aos demais coronavírus. Além das proteases clássicas de clivagem em outras infecções virais, como protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) e catepsina L, a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 também pode ser clivada por inúmeras outras proteases, como a furina, que está presente em inúmeros tecidos do organismo humano. Fato que pode justificar a alta patogenicidade do SARS-CoV-2 (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020)

Figura 3 - Ciclo de replicação viral: Reprodução intracelular de partículas virais.



Fonte: (SHEREEN *et al.*, 2020)

Por fim, a proteína do nucleocapsídeo, proteína N, está associada ao genoma viral. Possui papel fundamental na transcrição e replicação do RNA viral. Dentre as suas funções podemos destacar a ligação ao genoma do RNA viral e o empacotamento do genoma em um nucleocapsídeo helicoidal dentro do genoma viral, regulando a síntese do RNA viral durante a replicação. A proteína N também demonstrou ser altamente imunogênica, sendo capaz induzir a resposta imune do hospedeiro contra SARS-CoV-2, participando no processo de inibição da resposta do interferon tipo 1 pela célula infectada e induzindo a apoptose (ALBUQUERQUE; SILVA; ARAÚJO, 2020; KANG *et al.*, 2020).

A proteína N do SARS-CoV-2 apresentou cerca de 90,52% de homologia com a proteína N do SARS-CoV (ZENG *et al.*, 2020). É composta por três partes: um domínio de ligação RNA N-terminal (NTD), um domínio de dimerização C-terminal (CTD) ligado por uma região de ligação mal estruturada (LKR) contendo um domínio rico em serina/arginina (SRD). Esta última região é responsável pela fosforilação primária, enquanto que o NTD é responsável pela ligação do RNA e o CTD pela oligomerização (KANG *et al.*, 2020). A região desordenada é responsável por manter a conformação do genoma estável durante o processo de replicação. É altamente carregada positivamente, o que favorece a ligação da proteína N com ácidos nucleicos (ZENG *et al.*, 2020).

Foi demonstrada a existência de anticorpos IgG, IgA e IgM contra o antígeno N em soro de pacientes em recuperação da COVID-19 (ZENG *et al.*, 2020), reforçando a possibilidade de utilização da proteína N como um possível alvo de medicamentos e vacinas contra a COVID-19.

1.3 TRATAMENTOS PROPOSTOS

O SARS-CoV-2 é um beta-coronavírus que compartilha 79% de homologia com SARS-CoV e 50% com MERS-CoV de acordo com as análises evolutivas (ZHANG *et al.*, 2020), compartilhando estruturas virais e mecanismos de virulência semelhantes. A grande similaridade estrutural entre os vírus SARS-CoV-2 e SARS-CoV ou MERSCoV, e suas apresentações clínicas semelhantes sugerem que estes possam responder de maneira similar aos tratamentos (LIU *et al.*, 2020). Com base nas epidemias anteriores de SARS-CoV e MERS-CoV, já se sabe que alguns antivirais

não funcionam bem para tratamento de infecções causadas por coronavírus (GUO *et al.*, 2020).

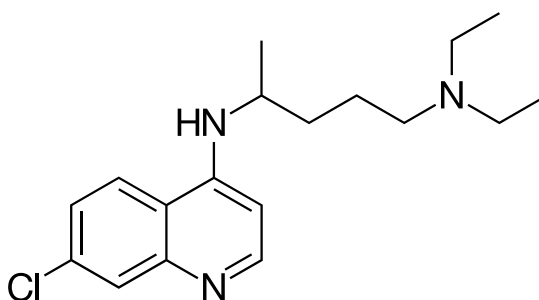
Até o momento não há nenhum medicamento antiviral específico para o tratamento da COVID-19. Devido a urgência da situação, as principais opções são as terapias de reposicionamento de medicamentos aprovados, ou em desenvolvimento, para tratamento de infecções causadas por alguns vírus já bem conhecidos, como o vírus da Hepatite B (HBV), Hepatite C (HBC), Influenza, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), etc. (RAMESHRAD *et al.*, 2020).

Algumas opções foram aprovadas para testes clínicos, como por exemplo, lopinavir/ritonavir, arbidol, interferon-alfa, favipiravir, fosfato de cloroquina, darunavir/cobicistate, oseltamivir e metilprednisolona (HELMY *et al.*, 2020).

Recentemente, em 19 de março de 2021, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou uma nota técnica em que aprova para o medicamento remdesivir para tratamento da COVID-19 em adultos e adolescentes, com idade ≥ 12 anos e peso corporal mínimo de 40kg, com pneumonia e que requerem administração suplementar de oxigênio (ANVISA, 2021).

1.3.1 Antimaláricos

Figura 4 – Estrutura 2D da cloroquina



Fonte: Elaborada pela própria autora

A cloroquina (Figura 4) é um medicamento cujo uso é aprovado para o tratamento de malária e doenças autoimunes. Sua utilização na COVID-19 foi baseada na evidência de que a cloroquina interfere no pH endossomal, tornando mais alcalino e assim afetando a etapa de entrada e saída das partículas virais, já que esta etapa é dependente de pH ácido (GUO *et al.*, 2020; RAMESHRAD *et al.*, 2020). No

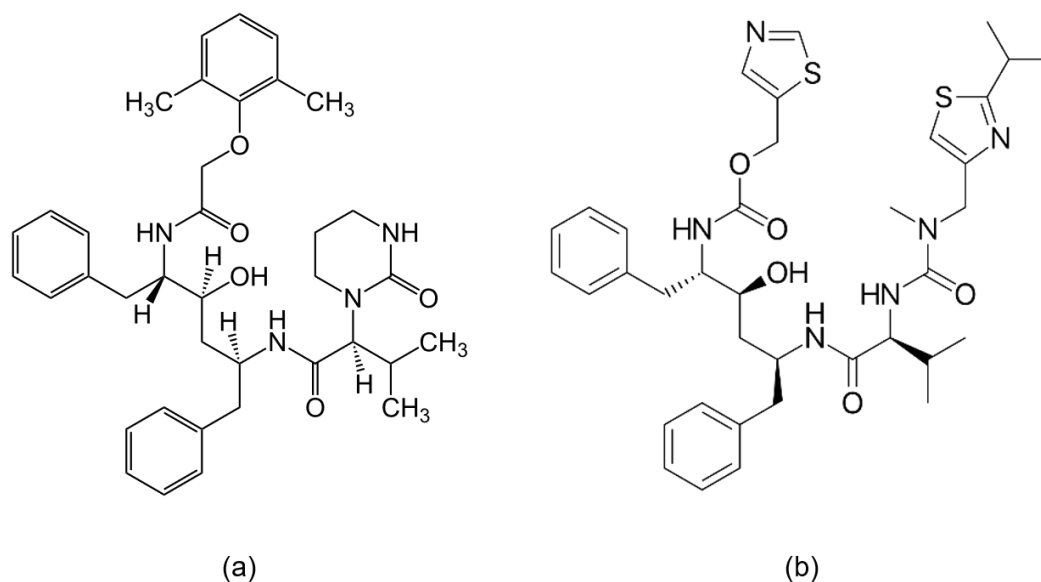
entanto, não há nenhuma informação que comprove a eficácia e segurança da cloroquina no tratamento e profilaxia da COVID-19 (GHAZY *et al.*, 2020; PAHO, 2021).

Um dos principais efeitos adversos relacionados a utilização da cloroquina é a alteração (prolongamento) do intervalo QT, podendo gerar problemas cardiovasculares, como arritmias. Além disso, problemas dermatológicos, hipoglicemia severa, cólicas abdominais, vômitos e diarreias, problemas metabólicos, endócrinos e gastrointestinais foram relatados como efeitos adversos da cloroquina (BARLOW *et al.*, 2020; CHARY *et al.*, 2020; RAMESHRAD *et al.*, 2020).

1.3.2 Antivirais

O lopinavir (Figura 5a) coformulado com ritonavir (Figura 5b), representado por LPV/r, para aumentar a atividade farmacocinética e a meia-vida do LPV por meio da inibição do CYP450, combinados ou isolados, se mostraram úteis no tratamento de infecções virais como SARS, MERS e HIV (BARLOW *et al.*, 2020; CHU *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2020).

Figura 5 – Estrutura 2D dos antivirais (a) lopinavir e (b) ritonavir



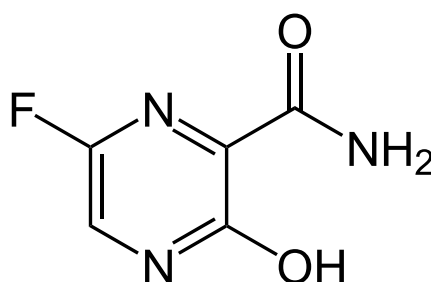
Fonte: Elaborada pela própria autora

Esses dois fármacos são antiretrovirais pertencentes a classe dos inibidores de protease e atuam na inibição das proteases responsáveis pela clivagem das partículas

virais, originando partículas imaturas e não infecciosas, incapazes de dar prosseguimento a infecção. Por demonstrar eficácia na inibição da infecção por HIV, despertou o interesse em testá-los em outras infecções virais que se desenvolvem de maneira semelhante. Com base no fato de que as proteases do SARS-CoV-2 e HIV pertencem a famílias diferentes, não foi observado muito efeito no uso destes medicamentos no tratamento de COVID-19, apesar de ter sido uma das primeiras recomendações (BARLOW *et al.*, 2020; RAMESHRAD *et al.*, 2020). Além disso, possuem efeitos adversos consideráveis como dislipidemia, diarreia, vômito, aumento de enzimas hepáticas e alteração na condução cardíaca. Ambos são metabolizados via CYP3A, favorecendo a ocorrência de interações medicamentosas, como o aumento da concentração plasmática, quando administrados concomitantemente com outros fármacos metabolizados por esta enzima (RAMESHRAD *et al.*, 2020).

Outro fármaco antirretroviral aprovado para estudos clínicos contra COVID-19 é o fapiravir (Figura 6). O fapiravir é um inibidor da RNA polimerase, impedindo a replicação dos vírus através do bloqueio da síntese de novo RNA viral (CHARY *et al.*, 2020; ECONOMIA, 2020), sendo aprovado para uso no Japão no tratamento de gripes desde 2014 (RAMESHRAD *et al.*, 2020). Por atuar de forma satisfatória no controle de infecções provocadas por vírus de RNA, como influenza, Ebola, febre amarela, chikungunya, norovírus e enterovírus, este medicamento foi introduzido nas pesquisas clínicas contra COVID-19 no Japão em 2020 (RAMESHRAD *et al.*, 2020).

Figura 6 – Estrutura 2D do antiviral fapiravir



Fonte: Elaborada pela própria autora

Outros antivirais propostos para tratamento de COVID-19 incluem indinavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, saquinavir, abacavir, elvitegravir, raltegravir,

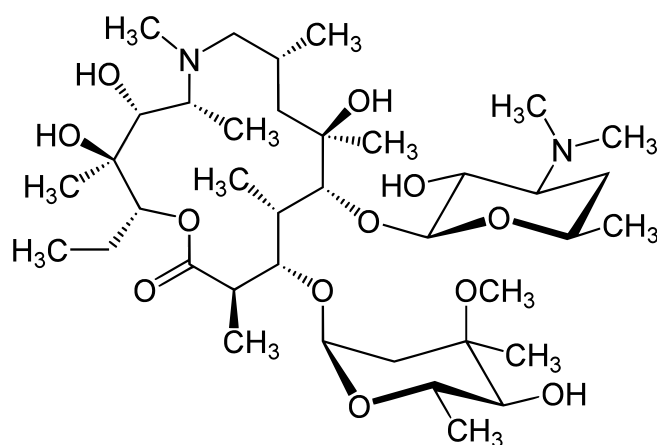
enzaplatovir, presatovir, maribavir, tipranavir, darunavir, e estão inclusos em estudos para avaliar sua eficácia e segurança. (RAMESHRAD *et al.*, 2020; SANG *et al.*, 2020).

1.3.3 Antibacterianos

A amoxicilina, azitromicina ou fluoroquinolonas são os fármacos antibacterianos indicados no tratamento de casos de pneumonia adquirida, sendo recomendados também em casos de COVID-19 (RAMESHRAD *et al.*, 2020).

A azitromicina (Figura 7), um antibacteriano da classe dos macrolídeos, é indicada no tratamento de infecções no trato respiratório inferior, atuando no bloqueio da síntese proteica ao inibir a transpeptidação/translocação da síntese proteica e a inibição da montagem da subunidade ribossômica 50S, passo importante na replicação bacteriana (EUROFARMA, [S.d.]). A azitromicina é o principal antibacteriano adicionado ao regime de tratamento da COVID-19, associado a hidroxicloroquina, onde foi observado um sinergismo na eliminação do vírus (RAMESHRAD *et al.*, 2020). Além disso, a azitromicina apresenta efeitos antiinflamatórios e propriedades antivirais (CHARY *et al.*, 2020; RAMESHRAD *et al.*, 2020). Devido ao alto risco de desenvolvimento de resistência a antibióticos, seu uso não é recomendado, exceto quando há casos de co-infecção em que há pneumonia provocada por bactérias.

Figura 7 – Estrutura 2D da azitromicina



Fonte: Elaborada pela própria autora.

O principal efeito adverso observado da azitromicina é o prolongamento do intervalo QT, assim como o presente na cloroquina, portanto, essa terapia combinada deve ser melhor avaliada devido ao alto risco de arritmias cardíacas graves (CHARY *et al.*, 2020; EUROFARMA, [S.d.]; RAMESHRAD *et al.*, 2020).

1.3.4 Plasma Convalescente

Outra estratégia adotada para auxiliar no tratamento e recuperação de pacientes com COVID-19 foi a administração de plasma convalescente, ou seja, injeção de plasma de pacientes infectados que já se recuperaram, contendo as imunoglobulinas contra o SARS-CoV-2 que auxiliam o sistema imune do paciente na eliminação do vírus.

Os estudos demonstraram que a utilização de plasma convalescente em pacientes de COVID-19 levou a cargas virais quase indetectáveis, reduziu a hipóxia, melhorou a oxigenação, diminuindo o tempo de internação hospitalar e mortalidade (CHARY *et al.*, 2020; RAMESHRAD *et al.*, 2020).

Os riscos que envolvem a utilização dessa terapia são lesão pulmonar associada a transfusão, sobrecarga circulatória associada a transfusão e reações anafiláticas (CHARY *et al.*, 2020). Outros efeitos adversos observados são hipotensão e hipertensão, taquicardia e redução da frequência cardíaca, prurido no local de aplicação, dor de cabeça, fadiga, calafrios, anormalidades hematológicas, aumento das enzimas hepáticas, etc (RAMESHRAD *et al.*, 2020).

1.3.5 Anti-helmínticos e Antiprotozoários

1.3.5.1 Ivermectina

A ivermectina é um fármaco anti-helmíntico, cujo mecanismo de ação é baseado na estimulação dos canais de ácido gama-aminobutírico (GABA), que provoca a hiperpolarização das membranas celulares, levando a paralização do agente infectante (GUPTA; SAHOO; SINGH, 2020). Este fármaco tem atividade contra parasitas, nematóides, artrópodes e flavivírus, além da imunomodulação da resposta do hospedeiro como um mecanismo de ação adjuvante, através da ativação de

neutrófilos, aumento dos níveis de proteína C reativa e interleucina-6 (GUPTA; SAHOO; SINGH, 2020; HEIDARY; GHAREBAGHI, 2020).

A ivermectina já demonstrou atividade antiviral contra dengue e chikungunya e, a partir disso, sua atividade foi avaliada contra outros vírus, chegando a uma atividade *in vitro* contra coronavirus (GUPTA; SAHOO; SINGH, 2020; HEIDARY; GHAREBAGHI, 2020). Os efeitos antivirais da ivermectina podem ser associados a inibição do receptor α/β da importina, que é responsável por carrear as proteínas virais até o núcleo da célula hospedeira para replicação (HEIDARY; GHAREBAGHI, 2020). A ivermectina demonstrou também efeito antiinflamatório *in vitro* e *in vivo*, ao reduzir a produção de citocinas inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1 e IL-6, e suprimindo a translocação de NF-kB induzida por LPS (ACCINELLI; PORTMANN-BARACCO; BRYCE-ALBERTI, 2020).

Como as condições de replicação viral são diferentes *in vitro* e *in vivo*, a eficácia e segurança da ivermectina contra SARS-CoV-2 não pode ainda ser confirmada. Entretanto, as reações observadas em outros tratamentos cogitados para a COVID-19, como lesão retinal irreversível, prolongamento do intervalo QT, miopatia, neuropatia associados ao uso de hidroxicloroquina, e hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia associados ao uso de lopinavir/ritonavir, não foram observadas durante os estudos clínicos com a ivermectina. Isso demonstra um possível perfil de tratamento com maior segurança, além de mais economia (GUPTA; SAHOO; SINGH, 2020). No entanto, ainda são necessários testes clínicos que comprovem de fato seu mecanismo de ação, perfil de segurança e toxicidade e a eficácia contra o SARS-CoV-2. Até o momento a utilização de Ivermectina para tratamento de COVID-19 é baseado em uso *off label*.

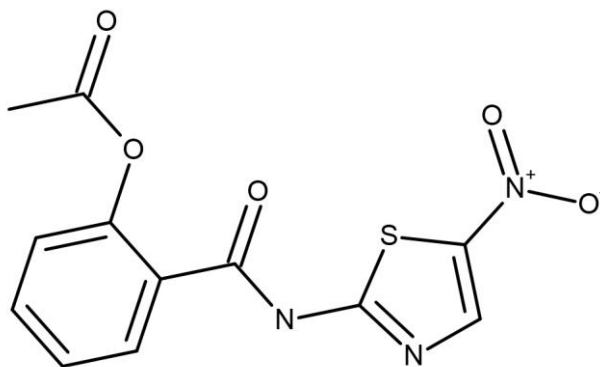
1.3.5.2 Nitazoxanida

A nitazoxanida (NTZ), ou 2-(acetiloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida (Figura 8) é um medicamento aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para combater infecções intestinais parasitárias provocadas por *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* (JASENOSKY *et al.*, 2019; ROSSIGNOL, 2014).

No organismo humano, a nitazoxanida é metabolizada e convertida no seu metabólito ativo, a tizoxanida. Foi sintetizada a partir da niclosamida, através da substituição de um benzeno por um grupamento nitroiazol (ROSSIGNOL, 2014).

A nitazoxanida e seu metabólito, tozixanida, além de demonstrarem efeito antiparasitário, possuem também atividade *in vitro* comprovada contra uma gama de bactérias anaeróbicas obrigatórias e gram negativas, cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, inibe a replicação de diversas cepas de influenza A e B, como subtipos de influenza A H1N1, H3N2, H3N2v, H3N8, H5N9, H7N1 e algumas resistentes a oseltamivir e amantadina, além da inibição em cultura celular *in vitro* de outros vírus de RNA e DNA, tais como vírus sincicial respiratório, parainfluenza, coronavírus, rotavírus, norovírus, hepatite B, hepatite C, dengue, febre amarela, EBOLA, vírus da encefalite japonesa e HIV (JASENOSKY *et al.*, 2019; ROSSIGNOL, 2014, 2016). Existem estudos clínicos de fase 3 em desenvolvimento para aprovação do uso da nitazoxanida em casos de influenza aguda não complicada, além do seu reaproveitamento em infecções respiratórias virais (ROSSIGNOL, 2016).

Figura 8 – Estrutura 2D da nitazoxanida



Fonte: Elaborada pela própria autora

Sua atividade viral de amplo espectro pode ser associada a sua interferência nos mecanismos de regulação das vias envolvidas com a replicação viral no hospedeiro, portanto não atua especificamente no vírus (ROSSIGNOL, 2016).

Estudos demonstraram um grande potencial da nitazoxanida na inibição da replicação *in vitro* de MERS-CoV e outros coronavírus, através da inibição da proteína N viral. Os valores de IC₅₀ foram de 0,92 e 0,83 µg ml⁻¹ para nitazoxanida e tizoxanida,

respectivamente, na inibição do MERS-CoV, cujas concentrações foram semelhantes para outros vírus (ROSSIGNOL, 2016).

Além da atividade observada na inibição da proteína N viral, também foi verificada que a nitazoxanida tem efeito sobre produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-2, IL-4, I-5, IL-6, IL-8 e IL-10 em células mononucleares do sangue periférico, sugerindo um grande potencial da nitazoxanida em inibir a superprodução de citocinas inflamatórias presente na infecção por coronavírus (ROSSIGNOL, 2016).

Existem estudos clínicos em andamento para aprovação da nitazoxanida no combate a diversas infecções virais, incluindo a influenza e MERS-CoV, e o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação prolongada do fármaco também se encontram em andamento, para o tratamento destas infecções. A nitazoxanida já foi amplamente utilizada no mundo todo para tratamento de infecções intestinais parasitárias, apresentando alta segurança, inclusive em crianças e idosos (ROSSIGNOL, 2014, 2016).

A ampla atividade antiviral da nitazoxanida e seu metabólito, a tizoxanida, demonstrada pelos estudos *in vitro*, sugerem um grande potencial de aproveitamento no tratamento de infecções virais respiratórias. No contexto da COVID-19, estudos *in vitro* mostraram que a nitazoxanida apresentou um EC₅₀ de 2,12 μ M para SARS-CoV-2, similar ao valor de EC₅₀ de 2,99 μ M para MERS-CoV (NITULESCU *et al.*, 2020; PEPPERRELL, *et al.*, 2020). Além disso, considerando que é desejável que um tratamento para COVID-19 seja seguro, efetivo, barato e disponível, um estudo focado não apenas na nitazoxanida, mas também em outros tiazolídeos com propriedades semelhantes é de grande interesse na urgente busca por um tratamento para a COVID-19.

1.4 DOCKING MOLECULAR

Nos últimos anos, o desenvolvimentos tecnológico de computadores mais potentes, softwares eficientes e melhoria dos métodos matemáticos e algoritmos, levaram a uma maior procura e utilização de métodos computacionais em pesquisas (GUERRA, 2016).

As metodologias computacionais auxiliares na descoberta de fármacos, como triagem virtual baseada em estrutura (SBVS), triagem virtual baseada em ligante

(LBVS), *docking molecular* e simulação de dinâmica molecular (MD), são importantes ferramentas aliadas ao processo de desenvolvimento de medicamentos. Visto que o desenvolvimento de medicamentos é um processo longo, caro e demorado, a possibilidade de realizar testes e triagens virtuais, identificando possíveis candidatos a fármacos, antes de realizar testes *in vitro* e *in vivo*, torna o processo de desenvolvimento mais rápido e barato, além de aumentar as chances de sucesso (FERREIRA *et al.*, 2015; KERETSU; BHUJBAL; CHO, 2020). Essas técnicas computacionais têm sido utilizadas com cada vez mais frequência, desde as pesquisas acadêmicas até as grandes indústrias (LEELANANDA; LINDERT, 2016).

O *docking molecular* é uma ferramenta da bioinformática que possibilita a previsão da orientação de uma molécula ligada a outra molécula. Neste processo, é avaliada a interação da proteína com o ligante, buscando encontrar a pose de maior afinidade de ligação entre um receptor e um ligante (SINGH; FLOREZ, 2020). É capaz de estabelecer qual seria a orientação mais provável de uma molécula em relação ao seu ligante no sistema em que se encontram, além das interações que favorecem e desfavorecem a formação da ligação entre alvo e ligante e as posições do ligante (FERREIRA *et al.*, 2015).

Existem diversos programas disponíveis para a realização de *docking molecular*. De um modo geral, esses programas trabalham em busca de uma conformação do ligante-alvo que apresente menor energia. A identificação das conformações é feita em duas etapas: (1) exploração conformacional dos diversos modos de ligação potenciais e (2) previsão da energia de interação de cada uma das conformações previstas. A conformação é avaliada por funções de pontuação específicas, em que os programas realizam esses cálculos de forma cíclica até que haja a conversão para uma conformação de energia mínima (FERREIRA *et al.*, 2015). Estes métodos envolvem funções de energia com parâmetros eletrostáticos, tais como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e /ou interações hidrofóbicas, gerando uma série de modelos matemáticos que irão predizer as melhores posições para o ligante interagir com seu biorreceptor, e gerar um grupo de conformações que são ordenadas baseado em scores de energia, de acordo com a estabilidade dos modos de ligação que se aproximam dos resultados experimentais (SILVA, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa auxiliar no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos com potencial para uso na quimioterapia da infecção viral SARS-CoV-2 através de avaliação *in silico* da interação da nitazoxanida e derivados com a proteína N viral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma busca na literatura por compostos análogos da nitazoxanida;
- Construir através da modelagem por homologia um modelo da proteína N de SARS-CoV-2;
- Realizar estudos de docking molecular dos compostos selecionados na literatura com a proteína N viral;
- Realizar uma avaliação *in silico* do perfil farmacocinético e toxicológico dos compostos estudados.

3 JUSTIFICATIVA

O surto atual do novo coronavírus, SARS-CoV-2, agente causador da COVID-19, se espalhou rapidamente ao redor do planeta, infectando e matando milhões de pessoas.

Um ano após a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar a COVID-19 como uma pandemia, o número de casos mundialmente acumulados já ultrapassa 121 milhões com mais de 2,6 milhões de mortes ao redor do globo. O Brasil ocupa o 2º lugar dentre os países com maior número de infectados, com mais de 11 milhões de casos e 287 mil mortes.

Considerando a fragilidade de grande parte dos sistemas de saúde e o impacto que uma pandemia pode provocar na economia e estruturas de saúde, a atual pandemia da COVID-19 representa um enorme risco de falência para os sistemas de saúde global, principalmente nos países pobres e em desenvolvimento.

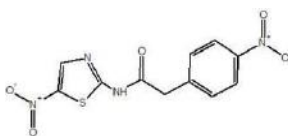
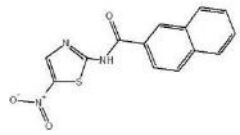
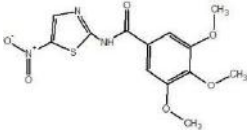
A inexistência de um tratamento eficaz e seguro contra a infecção com SARS-Cov-2 e a burocracia envolvida na aquisição de vacinas para imunização da população, nos leva a voltar os olhos para potenciais pesquisas que resultem em novas propostas para o tratamento e/ou profilaxia da COVID-19.

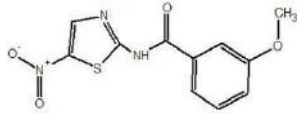
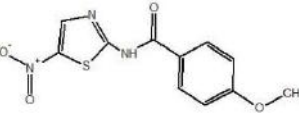
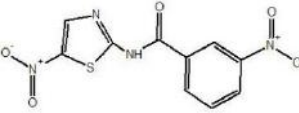
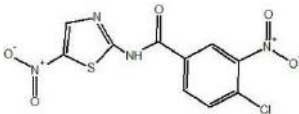
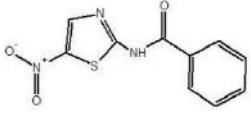
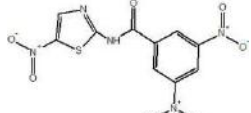
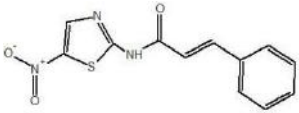
4 METODOLOGIA

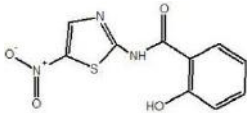
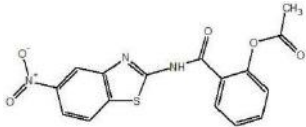
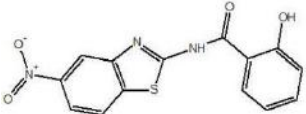
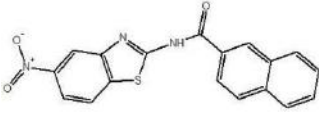
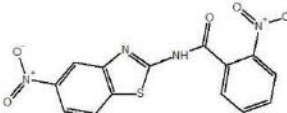
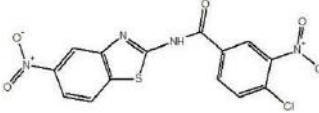
4.1 SELEÇÃO DOS LIGANTES

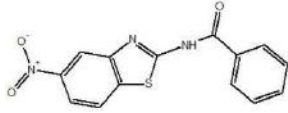
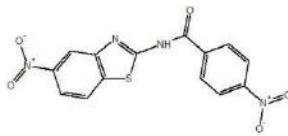
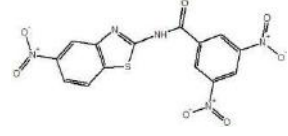
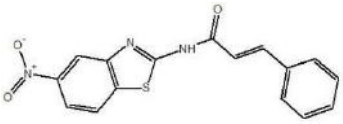
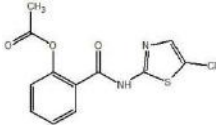
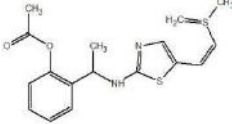
Foi realizada uma busca na literatura para selecionar compostos análogos da Nitazoxanida com alguma atividade biológica descrita. Para isso o Google Acadêmico (<https://scholar.google.com.br/?hl=pt>) e as seguintes palavras-chave foram utilizadas na busca: “nitazoxanide”, “nitazoxanide derivatives” e “thiazolide”. Os compostos selecionados serviram como os ligantes no processo de *docking* molecular com a proteína N viral. Foram selecionados 87 compostos nessa busca, conforme Tabela 1.

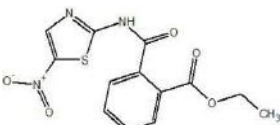
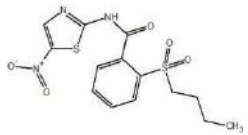
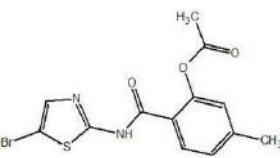
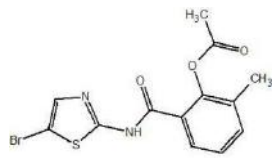
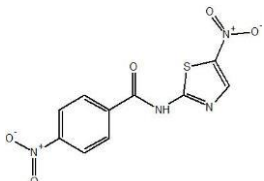
Tabela 1. Tiazolídeos selecionados na literatura para o estudo de docking molecular

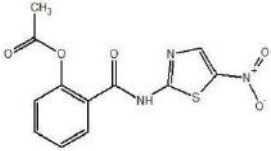
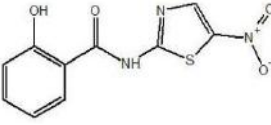
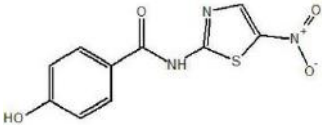
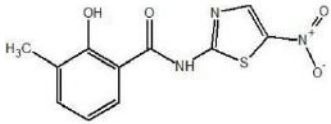
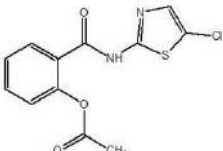
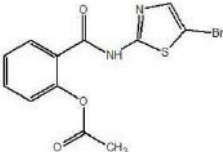
ID	Molécula	Atividade Biológica		Referência
		Agente	IC50 (µM)	
1	 $C_{12}N_4H_8SO_5$ SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+][O-])C=Cc2ccc([N+][O-])cc2</chem>	<i>E. histolytica</i>	8,30 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
2	 $C_{14}N_3H_9SO_3$ SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+][O-])c3cc2ccccc2cc3</chem>	<i>E. histolytica</i>	7,92 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
3	 $C_{13}N_3H_{13}SO_6$ SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+][O-])c2cc(OC)c(OC)c(OC)c2</chem>	<i>E. histolytica</i>	8,15 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)

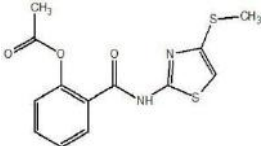
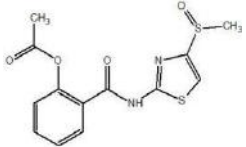
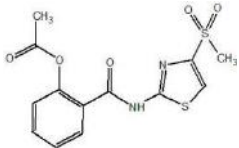
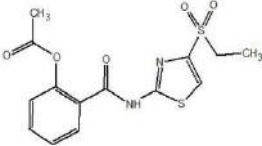
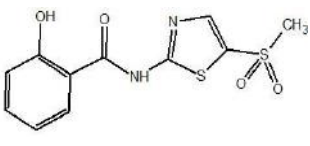
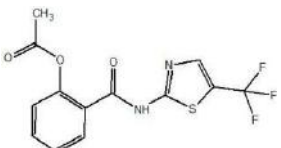
4	 <p style="text-align: center;">$C_{11}N_3H_9SO_4$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2cccc(OC)c2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	7,46 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
5	 <p style="text-align: center;">$C_{11}N_3H_9SO_4$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2cccc(OC)c2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	7,92 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
6	 <p style="text-align: center;">$C_{10}N_4H_6SO_5$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2cccc([N+](O-)=O)c2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	7,82 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
7	 <p style="text-align: center;">$C_{10}N_4H_4SO_5Cl$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccc(Cl)c([N+](O-)=O)c2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	7,92 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
8	 <p style="text-align: center;">$C_{10}N_3H_7SO_3$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccccc2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	6,07 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
9	 <p style="text-align: center;">$C_{10}N_5H_5SO_7$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2cc([N+](O-)=O)cc([N+](O-)=O)c2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	5,83 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)
10	 <p style="text-align: center;">$C_{10}N_3H_9SO_3$</p> <p style="text-align: center;">SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)CCc2ccccc2</chem></p>	<i>E. histolytica</i>	6,34 ^a	(SCIOR <i>et al.</i> , 2015)

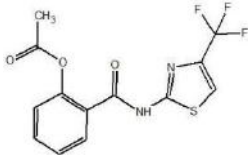
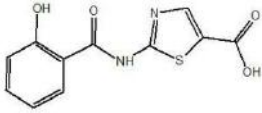
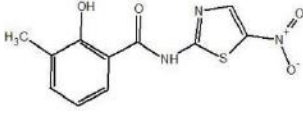
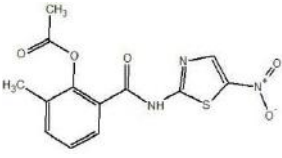
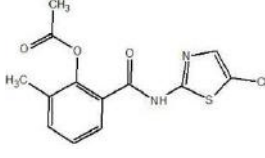
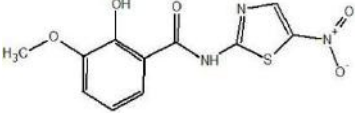
- $C_{12}N_3H_9SO_3$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+]([O-])=O)C=Cc2ccccc2
- 11
- 
- $C_{10}N_3H_5SO_4$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+]([O-])=O)c2ccccc2O
- E. histolytica* 5,91^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- 12
- 
- $C_{16}N_3H_{11}SO_5$
 SMILES: O=C(Oc1ccccc1C(=O)Nc2nc3ccc(cc3s2)[N+]([O-])=O)C
- E. histolytica* 5,45^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- 13
- 
- $C_{14}N_3H_9SO_4$
 SMILES: [O-][N+](=O)c1ccc2nc(sc2c1)NC(=O)c3ccccc3O
- E. histolytica* 5,10^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- 14
- 
- $C_{18}N_3H_{10}SO_3$
 SMILES: [O-][N+](=O)c1ccc2nc(sc2c1)NC(=O)c4cc3ccccc3cc4
- E. histolytica* 5,19^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- 15
- 
- $C_{14}N_4H_8SO_5$
 SMILES: [O-][N+](=O)c1ccccc1C(=O)Nc2nc3ccc(cc3s2)[N+]([O-])=O
- E. histolytica* 4,98^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- 16
- 
- $C_{14}N_4H_7SO_5Cl$
- E. histolytica* 5,38^a (SCIOR *et al.*, 2015)

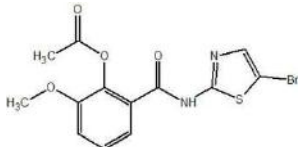
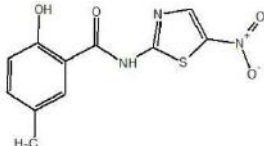
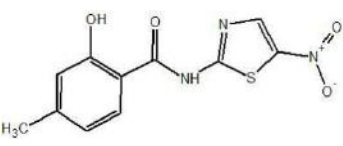
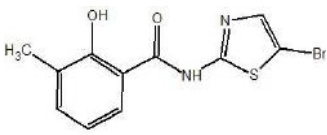
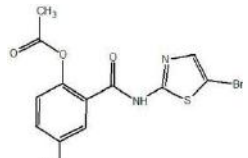
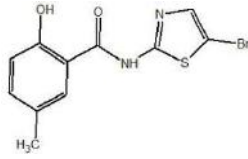
- SMILES: [O-]
][N+](=O)c1c(Cl)ccc(c1)C(=O)Nc2nc3ccc(cc3s2)[N+](
 [O-])=O
- 17 
 $C_{14}N_3H_9SO_3$ *E. histolytica* 5,04^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- SMILES: [O-][N+](=O)c1ccc2nc(sc2c1)NC(=O)c3ccccc3
- 18 
 $C_{14}N_4H_8SO_5$ *E. histolytica* 4,81^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- SMILES: [O-]
][N+](=O)c1ccc(cc1)C(=O)Nc2nc3ccc(cc3s2)[N+](
 [O-])=O
- 19 
 $C_{14}N_5H_6SO_7$ *E. histolytica* 5,07^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- SMILES: [O-][N+](=O)c1cc(cc([N+](
 [O-])=O)c1)C(=O)Nc2nc3ccc(cc3s2)[N+](
 [O-])=O
- 20 
 $C_{16}N_3H_{11}SO_3$ *E. histolytica* 4,72^a (SCIOR *et al.*, 2015)
- SMILES: [O-]
][N+](=O)c1ccc2nc(sc2c1)NC(=O)\C=C\c3ccccc3
- 21 
 $C_{12}N_2H_9SO_3Cl$ Dengue (YASMIN *et al.*, 2018)
- SMILES: Clc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2OC(=O)C
- 22 
 $C_{18}N_2H_{18}S_2O_2$ Dengue (YASMIN *et al.*, 2018)

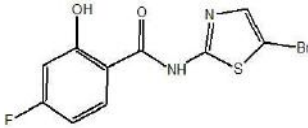
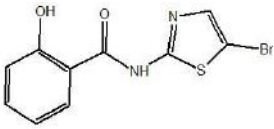
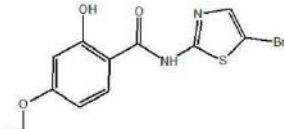
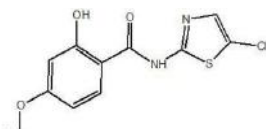
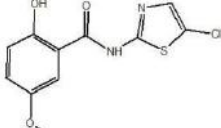
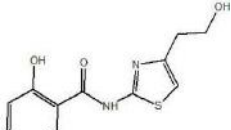
	<p>SMILES: <chem>O=C(Oc2ccccc2C(=N/c1ncc(s1)\C=C/C(/SC)=C)/C)C</chem></p>			
23	 <p><chem>C13N3H11SO5</chem></p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccccc2C(=O)OCC</chem></p>	Influenza H1N1	0,62 ± 0,34	(ZHAO <i>et al.</i> , 2020)
24	 <p><chem>C14N3H15S2O5</chem></p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccccc2S(=O)(=O)CCCC</chem></p>	Influenza H1N1	0,16 ± 0,05	(ZHAO <i>et al.</i> , 2020)
25	 <p><chem>C13N2H11SO3Br</chem></p> <p>SMILES: <chem>Brc1sc(nc1)NC(=O)c2ccc(cc2OC(=O)C)C</chem></p>	<i>Besnoitia besnoiti</i>		(CORTES <i>et al.</i> , 2007)
26	 <p><chem>C13N2H11SO3Br</chem></p> <p>SMILES: <chem>Brc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2OC(=O)C</chem></p>	<i>Besnoitia besnoiti</i>		(CORTES <i>et al.</i> , 2007)
27	 <p><chem>C10N4H6SO5</chem></p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccc([N+](O-)=O)cc2</chem></p>	<i>Leishmania mexicana</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>	2,533 15,021	(CHAN-BACAB; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ; NAVARRETE-VÁZQUEZ, 2008)

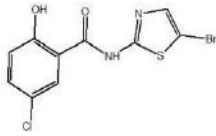
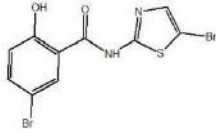
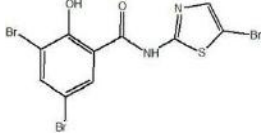
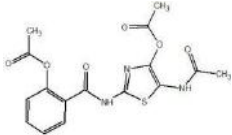
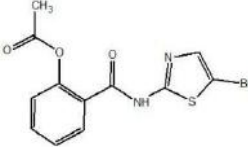
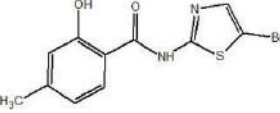
- 28 
 $C_{12}N_3H_9SO_5$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 3,3 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 29 
 $C_{10}N_3H_7SO_4$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccccc2O
 Influenza A 3,8 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 30 
 $C_{10}N_3H_7SO_4$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2ccc(O)cc2
 Influenza A 0,4 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 31 
 $C_{11}N_3H_9SO_4$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](O-)=O)c2cccc(c2O)C
 Influenza A 7,2 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 32 
 $C_{12}N_2H_9SO_3Cl$
 SMILES: Clc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 3,4 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 33 
 $C_{12}N_2H_9SO_3Br$
 SMILES: Brc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 5,9 (STACHULSKI *et al.*, 2018)

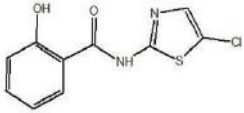
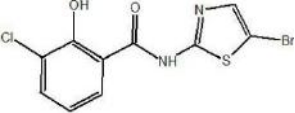
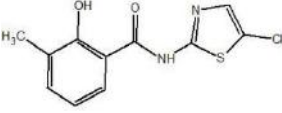
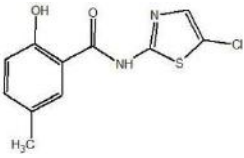
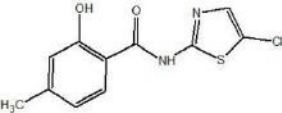
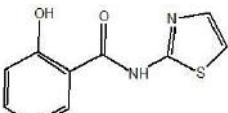
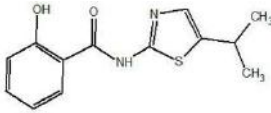
- 34 
 $C_{13}N_2H_{12}S_2O_3$
 SMILES: O=C(Nc1nc(SC)cs1)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 4,9 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 35 
 $C_{13}N_2H_{13}S_2O_4$
 SMILES: O=C(Nc1nc(S(=O)C)cs1)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 31 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 36 
 $C_{13}N_2H_{14}S_2O_5$
 SMILES: O=C(Nc1nc(cs1)S(=O)(=O)C)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 0,29 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 37 
 $C_{14}N_2H_{16}S_2O_5$
 SMILES: O=C(Nc1nc(cs1)S(=O)(=O)CC)c2ccccc2OC(=O)C
 Influenza A 0,14 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 38 
 $C_{11}N_2H_{12}S_2O_4$
 SMILES: O=C(Nc1ccc(O)cc1)S(=O)(=O)C
 Influenza A 34 (STACHULSKI *et al.*, 2018)
- 39 
 $C_{13}N_2H_6SO_3F$
 SMILES: O=C(Nc1ccc(OC)cc1)C(F)(F)F
 Influenza A 9,1 (STACHULSKI *et al.*, 2018)

40		Influenza A	6,1	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2018)
	C ₁₃ N ₂ H ₉ SO ₃ F			
	SMILES: O=C(Nc1nc(cs1)C(F)(F)F)c2ccccc2OC(=O)C			
41				(7)
	C ₁₁ N ₂ H ₈ SO ₄			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)C(=O)O)c2ccccc2O			
42		<i>Neospora caninum</i>	99,19 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	C ₁₁ N ₃ H ₉ SO ₄			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](=[O-])=O)c2cccc(c2O)C			
43		<i>Neospora caninum</i>	99,88 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	C ₁₃ N ₃ H ₁₁ SO ₅			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](=[O-])=O)c2cccc(c2OC(=O)C)C			
44		<i>Neospora caninum</i>	95,34 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	C ₁₃ N ₂ H ₁₁ SO ₃ Cl			
	SMILES: Clc1sc(nc1)NC(=O)c2cccc(c2OC(=O)C)C			
45		<i>Neospora caninum</i>	99,53 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	C ₁₁ N ₃ H ₉ SO ₅			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+](=[O-])=O)c2cccc(OC)c2O			

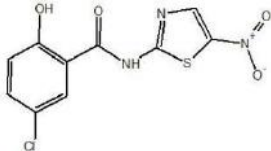
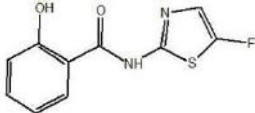
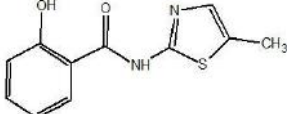
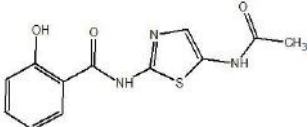
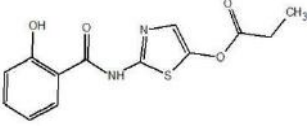
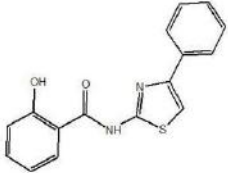
- 46 
 $C_{13}N_2H_{11}SO_4Br$
 SMILES: BrC1sc(nc1)NC(=O)c2cccc(OC)c2OC(=O)C
Neospora caninum 54,35^b (ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
- 47 
 $C_{11}N_3H_9SO_4$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+]([O-])=O)c2cc(ccc2O)C
Neospora caninum 99,95^b (ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
- 48 
 $C_{11}N_3H_9SO_4$
 SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)[N+]([O-])=O)c2ccc(cc2O)C
Neospora caninum 98,71^b (ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
- 49 
 $C_{11}N_2H_9SO_2Br$
 SMILES: BrC1sc(nc1)NC(=O)c2cccc(c2O)C
Neospora caninum 21,15^b (ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
- 50 
 $C_{13}N_2H_{11}SO_3Br$
 SMILES: BrC1sc(nc1)NC(=O)c2cc(ccc2OC(=O)C)C
Neospora caninum 99,94^b (ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
- 51 
 $C_{11}N_2H_9SO_2Br$
 SMILES: BrC1sc(nc1)NC(=O)c2cc(ccc2O)C
Neospora caninum 99,30^b (ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)

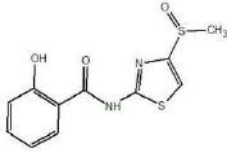
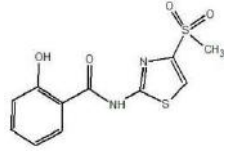
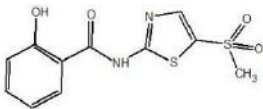
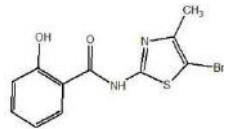
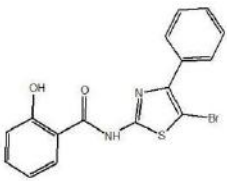
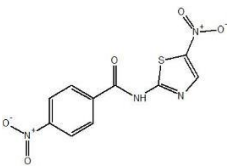
52		<i>Neospora caninum</i>	99,61 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	<p style="text-align: center;"><chem>C10N2H6SO2BrF</chem></p> <p>SMILES: <chem>Brc1sc(nc1)NC(=O)c2ccc(F)cc2O</chem></p>			
53		<i>Neospora caninum</i>	99,81 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	<p style="text-align: center;"><chem>C10N2H7SO2Br</chem></p> <p>SMILES: <chem>Brc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2O</chem></p>			
54		<i>Neospora caninum</i>	99,71 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	<p style="text-align: center;"><chem>C11N2H9SO3Br</chem></p> <p>SMILES: <chem>Brc1sc(nc1)NC(=O)c2ccc(OC)cc2O</chem></p>			
55		<i>Neospora caninum</i>	99,64 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	<p style="text-align: center;"><chem>C11N2H9SO3Cl</chem></p> <p>SMILES: <chem>Clc1sc(nc1)NC(=O)c2ccc(OC)cc2O</chem></p>			
56		<i>Neospora caninum</i>	96,18 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	<p style="text-align: center;"><chem>C11N2H9SO3Cl</chem></p> <p>SMILES: <chem>Clc1sc(nc1)NC(=O)c2cc(OC)ccc2O</chem></p>			
57		<i>Neospora caninum</i>	74,54 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
	<p style="text-align: center;"><chem>C12N2H12SO3</chem></p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1nc(cs1)CCO)c2ccccc2O</chem></p>			

58	 <p>$C_{10}N_2H_6SO_2BrCl$ SMILES: <chem>Brc1sc(nc1)NC(=O)c2cc(Cl)ccc2O</chem></p>	<i>Neospora caninum</i>	99,69 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
59	 <p>$C_{10}N_2H_6SO_2Br_2$ SMILES: <chem>Br c1sc(nc1)NC(=O)c2cc(Br)ccc2O</chem></p>	<i>Neospora caninum</i>	99,53 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
60	 <p>$C_{10}N_2H_5SO_2Br_3$ SMILES: <chem>Br c1sc(nc1)NC(=O)c2cc(Br)cc(Br)c2O</chem></p>	<i>Neospora caninum</i>	99,79 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
61	 <p>$C_{16}N_3H_{15}SO_6$ SMILES: <chem>O=C(N[C@H]1N=C(OC(=O)C)[C@H](S1)NC(=O)C)c2ccccc2OC(=O)C</chem></p>	<i>Neospora caninum</i>	68,27 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
62	 <p>$C_{11}N_2H_7SO_3Br$ SMILES: <chem>Br c1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2C(=O)O</chem></p>	<i>Neospora caninum</i>	66,74 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)
63	 <p>$C_{11}N_2H_9SO_2Br$ SMILES: <chem>Br c1sc(nc1)NC(=O)c2ccc(cc2O)C</chem></p>	<i>Neospora caninum</i>	99,64 ^b	(ESPOSITO; MU; HEMPHILL, 2007)

64	 <p>$C_{10}N_2H_7SO_2Cl$ SMILES: <chem>Clc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2O</chem></p>	HBV	0,33	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
65	 <p>$C_{10}N_2H_6SO_2BrCl$ SMILES: <chem>Brclsc(nc1)NC(=O)c2cccc(Cl)c2O</chem></p>	HBV	0,59	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
66	 <p>$C_{11}N_2H_8SO_2Cl$ SMILES: <chem>Clc1sc(nc1)NC(=O)c2cccc(c2O)C</chem></p>	HBV	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
67	 <p>$C_{11}N_2H_9SO_2Cl$ SMILES: <chem>Clc1sc(nc1)NC(=O)c2cc(ccc2O)C</chem></p>	HBV	0,90	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
68	 <p>$C_{11}N_2H_9SO_2Cl$ SMILES: <chem>Clc1sc(nc1)NC(=O)c2ccc(cc2O)C</chem></p>	HBV	2,70	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
69	 <p>$C_{10}N_2H_8SO_2$ SMILES: <chem>O=C(c1ccccc1O)Nc2nccs2</chem></p>	HBV	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
70	 <p>$C_{13}N_2H_{14}SO_2$ SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)C(C)C)c2ccccc2O</chem></p>	HBV	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)

71		HBV	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
	C ₁₆ N ₂ H ₁₁ SO ₂ Cl			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)c2ccc(Cl)cc2)c3ccccc3O			
72		HBV	0,22	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
	C ₁₇ N ₂ H ₁₄ SO ₂			
	SMILES: O=C(Nc2nc(c1ccccc1)cs2)c3cccc(c3O)C			
73		HBV	0,15	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
	C ₁₆ N ₂ H ₁₁ SO ₂ Cl			
	SMILES: O=C(Nc2nc(c1ccccc1)cs2)c3cccc(Cl)c3O			
74		HBV	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
	C ₁₂ N ₃ H ₁₁ SO ₃			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)NC(=O)C)c2ccccc2O			
75		HBV	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
	C ₁₂ N ₂ H ₁₀ SO ₄			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)NC(=O)C)c2ccccc2O			
76		HBV	3,8	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011a)
	C ₁₁ N ₂ H ₇ SO ₂ F ₃			
	SMILES: O=C(Nc1ncc(s1)C(F)(F)F)c2ccccc2O			

77		HBC	2,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
	<p style="text-align: center;">$C_{10}N_3H_6SO_4Cl$</p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ccc(s1)[N+](=[O-])=O)c2cc(Cl)ccc2O</chem></p>			
78		HBC	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
	<p style="text-align: center;">$C_{10}N_2H_7SO_2F$</p> <p>SMILES: <chem>Fc1sc(nc1)NC(=O)c2ccccc2O</chem></p>			
79		HBC	4,2	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
	<p style="text-align: center;">$C_{11}N_2H_{10}SO_2$</p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ccc(s1)C)c2ccccc2O</chem></p>			
80		HBC	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
	<p style="text-align: center;">$C_{12}N_3H_{11}SO_4$</p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ccc(s1)NC(=O)C)c2ccccc2O</chem></p>			
81		HBC	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
	<p style="text-align: center;">$C_{13}N_2H_{12}SO_4$</p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc1ccc(OC(=O)CC)s1)c2ccccc2O</chem></p>			
82		HBC	3,5	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
	<p style="text-align: center;">$C_{16}N_2H_{12}SO_2$</p> <p>SMILES: <chem>O=C(Nc2nc(c1ccccc1)cs2)c3ccccc3O</chem></p>			

83	 <p>$C_{11}N_2H_{10}S_2O_3$ SMILES: <chem>O=C(Nc2nc(c1ccccc1)cs2)c3ccccc3O</chem></p>	HBC	2,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
84	 <p>$C_{11}N_2H_{10}S_2O_4$ SMILES: <chem>O=C(Nc1nc(cs1)S(=O)(=O)C)c2ccccc2O</chem></p>	HBC	0,5	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
85	 <p>$C_{11}N_2H_{10}S_2O_4$ SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(s1)S(=O)(=O)C)c2ccccc2O</chem></p>	HBC	1,5	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
86	 <p>$C_{11}N_2H_9SO_2Br$ SMILES: <chem>O=C(Nc1nc(c(Br)s1)C)c2ccccc2O</chem></p>	HBC	>10,0	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
87	 <p>$C_{16}N_2H_{11}SO_2Br$ SMILES: <chem>O=C(Nc2nc(c1ccccc1)c(Br)s2)c3ccccc3O</chem></p>	HBC	2,2	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)
88	 <p>$C_{11}N_3H_7SO_2$ SMILES: <chem>O=C(Nc1ncc(C#N)s1)c2ccccc2O</chem></p>	HBC	37	(STACHULSKI <i>et al.</i> , 2011b)

^a O valor é apresentado como $-\log IC_{50}$; ^b % de inibição do crescimento celular. Fonte: Elaborada pela própria autora.

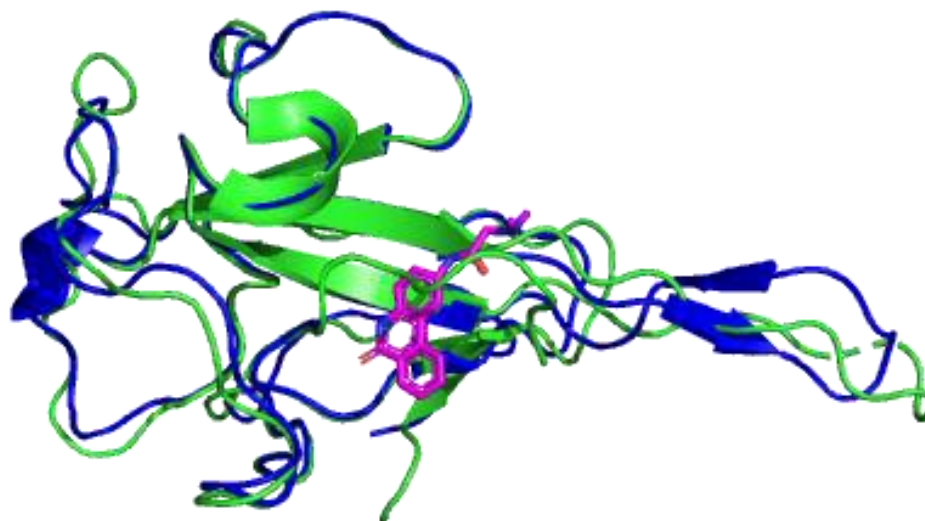
4.2 CONSTRUÇÃO DOS LIGANTES

Os compostos selecionados na literatura foram desenhados utilizando o programa Avogadro 1.2.0 (HANWELL *et al.*, 2012) e suas estruturas foram otimizadas no estado gasoso no nível semiempírico PM3 e caracterizadas como ponto mínimo na superfície de energia potencial através de cálculos de frequências harmônicas. Todos os cálculos foram realizados no programa computacional ORCA 4.2.1 (NEESE, 2018).

4.3 MODELAGEM COMPARATIVA DA PROTEÍNA N

Quando o projeto se iniciou, as estruturas da proteína N depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) estavam incompletas. Assim, o modelo com todos os resíduos da estrutura tridimensional da proteína N do vírus SARS-CoV-2 foi gerado por meio de modelagem comparativa usando como molde a estrutura da proteína N de SARS-CoV com código PDB 4KXJ (LIN, 2014), cocristalizada com o ligante PJ34, e a estrutura incompleta de proteína N de SARS-CoV-2 com código 6VYO (CHANG). A sequência modelada é a Uniprot:P0DTC9, região do sítio de ligação do RNA. O alinhamento das duas proteínas (Figura 9) resultou num RMSD (do inglês *root mean square deviation*) de 0,832 Å, indicando que as duas proteínas apresentam uma boa conservação dos resíduos e, portanto, a estrutura PDB 4KXJ está de acordo para a construção do modelo.

Figura 9 – Alinhamento das proteínas SARS-CoV (4KXJ), em verde, e SARS-CoV-2 (6VYO), em azul



Fonte: Elaborada pela própria autora

Para a construção do modelo da proteína N de SARS-CoV-2 foi utilizado o programa gratuito Modeller versão 9.24 (FISER; DO e SALI, 2000; SALI e BLUNDELL, 1993; MARTI-RENOM *et al.*, 2000; WEBB e SALI, 2016). Foram gerados 50 modelos, sendo selecionado um modelo para os ensaios de docking molecular. A seleção foi feita com base no menor valor de DOPE (do inglês *Discrete Optimized Potential Energy*), calculado pelo programa Modeller para cada modelo gerado, e avaliação estereoquímica baseada no mapa de Ramachandran.

4.4 DOCKING MOLECULAR

Inicialmente, foi realizado o redocking do inibidor PJ34 com a proteína 4KXJ visando validar a metodologia a ser utilizada no docking molecular. Posteriormente, foi realizado o docking molecular da nitazoxanida e dos 88 ligantes construídos com o modelo obtido da proteína N de SARS-CoV-2 (6VYO). Nos estudos de docking molecular, os ligantes foram definidos na caixa com os parâmetros $x = -7.121$, $y = 3.501$ e $z = 4.323$, onde essas coordenadas são o centro do ligante que foi modelado juntamente com a proteína. A caixa possui as dimensões $x = 14 \text{ \AA}$, $y = 14 \text{ \AA}$ e $z = 14 \text{ \AA}$, e foi definida uma exaustividade igual a 8. Os arquivos no formato pdbqt foram gerados no programa AutoDockTools 1.5.7 (TROTT e OLSON, 2010), com a proteína

preparada com a adição de hidrogênios polares. Os estudos de docking molecular foram realizados no programa AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT e OLSON, 2010).

4.5 PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO *IN SILICO*

Após uma análise inicial das energias de interação ligante-proteína, os compostos selecionados tiveram suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e toxicológicas, importantes do ponto de vista biológico, avaliadas teoricamente por meio dos portais OSIRIS Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>), pkCSM – pharmacokinetics (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) e Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Um dos servidores utilizados na avaliação farmacocinética e toxicológica foi o pkCSM, o qual avalia diversos parâmetros ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) de moléculas (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). O pkCSM utiliza assinaturas baseadas em gráficos que descrevem a química e topologia das moléculas, gerando 14 modelos de regressão quantitativos com saídas numéricas e outros 16 modelos de classificação preditiva com resultados categóricos para prever uma ampla variedade de propriedades ADMET (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Em relação ao pkCSM, foram aplicados filtros baseados nos resultados obtidos para os parâmetros de absorção intestinal, volume de distribuição, substrato OCT2 renal, teste de AMES, hepatotoxicidade e inibição hERG I e II.

A partir dessa avaliação será possível obter o perfil de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos compostos e selecionar aqueles que terão suas interações com a proteína mais relevantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 MODELAGEM COMPARATIVA DA PROTEÍNA N

No presente trabalho todas as simulações de *docking* molecular foram feitas usando um modelo da estrutura tridimensional da proteína N de SARS-CoV-2, obtida através do estudo de modelagem comparativa. Tal modelagem foi necessária pois, a época, as estruturas da proteína N depositadas no PDB estavam incompletas, ou seja, faltando fragmentos de resíduos de aminoácidos. Para a modelagem foram usadas como moldes (templates) as seguintes estruturas depositadas no PDB: 4KXJ e 6VYO. A estrutura 4KXY é uma proteína N de SARS-CoV com o ligante cocrystalizado PJ34, e a 6VYO é uma estrutura incompleta da proteína N de Sars-Cov-2. A identidade entre a estrutura primária das duas proteínas é de 47%. Foram gerados 50 modelos da proteína N usando o programa Modeller versão 9.24. O melhor modelo foi selecionado com base no menor valor do DOPE, calculado pelo programa Modeller para cada modelo gerado, e avaliação estereoquímica por meio do gráfico de Ramachandran (Figura 10), ou seja, modelo com maior número de resíduos com diedros favoráveis. A partir do gráfico de Ramachandran, pode ser observado que 98,5% (130/132 resíduos) estão em regiões favoráveis e 100,0% (132/132 resíduos) estão em regiões permitidas (> 99,8%).

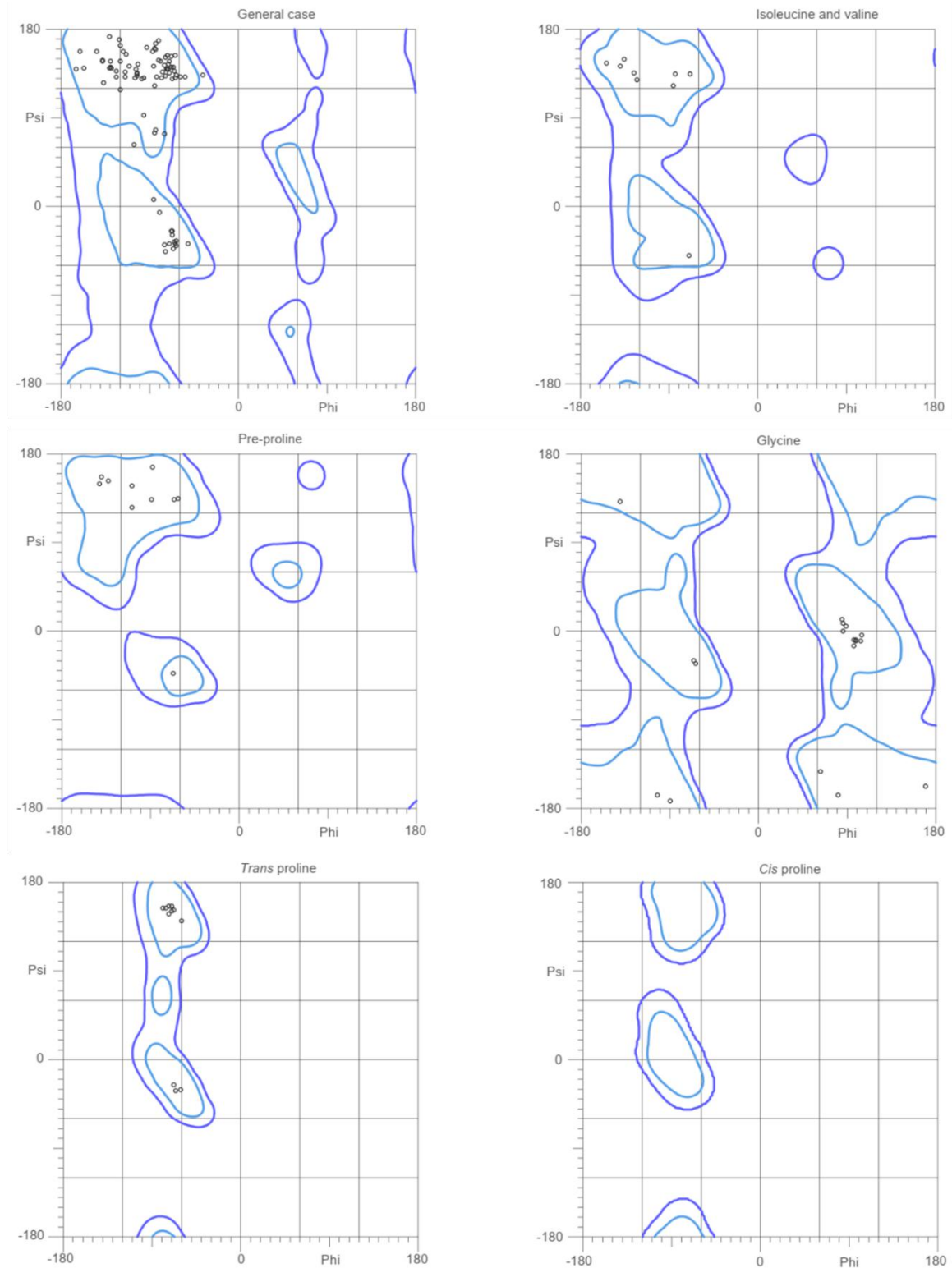
5.2 ESTUDO DE DOCKING MOLECULAR

Após a construção do modelo da proteína N de SARS-CoV-2 e da seleção, construção e otimização das geometrias dos ligantes, foram realizados estudos de docking molecular para a avaliar a interação ligante-proteína. Para cada tipo de ligante, a energia da interação entre o receptor (modelo) e o ligante é calculada. Em cada interação ligante-proteína, várias poses foram geradas e calculadas. Aquela com a menor energia é a pose preferencial, ou seja, com maior estabilidade química.

Inicialmente, foi realizado o docking molecular da nitazoxanida (NTZ) com a proteína N de SARS-CoV-2 (Figura 11), para ser utilizado como referência, uma vez que apenas para a NTZ estão disponíveis na literatura informações a respeito da sua interação com o vírus SARS-CoV-2. O docking da NTZ com a proteína resultou em

uma afinidade de ligação de $-6,7 \text{ kcal mol}^{-1}$, logo a NTZ apresenta uma interação favorável com o alvo.

Figura 10 - Gráfico de Ramachandran obtido na construção do modelo de proteína N de SARS-CoV-2



Fonte: Elaborada pela própria autora

Figura 11 – Interação da nitazoxanida (NTZ) com a proteína N de SARS-CoV-2



Fonte: Elaborada pela própria autora

Tabela 2. Afinidade de ligação (AL, kcal mol⁻¹), em ordem decrescente de energia, obtida para interação ligante-proteína de cada um dos compostos estudados

ID	AL	ID	AL	ID	AL	ID	AL	ID	AL	ID	AL
34	-5,4	3	-6,1	63	-6,3	36	-6,7	66	-6,9	45	-7,2
44	-5,5	23	-6,1	79	-6,3	38	-6,7	4	-7,0	87	-7,2
46	-5,6	54	-6,1	24	-6,4	41	-6,7	5	-7,0	17	-7,3
21	-5,7	55	-6,1	56	-6,4	61	-6,7	12	-7,0	28	-7,3
25	-5,7	80	-6,1	58	-6,4	67	-6,7	16	-7,0	31	-7,3
26	-5,7	86	-6,1	75	-6,4	68	-6,7	29	-7,0	42	-7,3
33	-5,7	65	-6,2	83	-6,4	69	-6,7	39	-7,0	73	-7,3
50	-5,7	70	-6,2	1	-6,5	81	-6,7	47	-7,0	82	-7,3
22	-5,9	27	-6,3	74	-6,5	84	-6,7	48	-7,0	9	-7,4
30	-5,9	43	-6,3	88	-6,5	85	-6,7	72	-7,0	2	-7,5
40	-5,9	49	-6,3	62	-6,6	10	-6,8	7	-7,1	19	-7,5
37	-6,0	51	-6,3	77	-6,6	18	-6,8	8	-7,1	14	-7,9
53	-6,0	52	-6,3	78	-6,6	76	-6,8	20	-7,1	15	-7,9
57	-6,0	59	-6,3	NTZ	-6,7	11	-6,9	71	-7,1		
64	-6,0	60	-6,3	35	-6,7	32	-6,9	13	-7,2		

ID = número de identificação do ligante. AL = afinidade de ligação em kcal mol⁻¹. Em vermelho e itálico é destacada a nitazoxanida (NTZ), fármaco utilizado como referência. Fonte: Elaborada pela própria autora.

Na Tabela 2 são apresentadas as afinidades de ligação calculadas, considerando a pose de menor energia, para cada interação ligante-proteína estudada. Pode ser observado que todos os valores de energia calculados foram negativos, indicando que todos os ligantes estudados apresentam uma interação favorável com a proteína N.

Como a nitazoxanida (NTZ) foi adotada como composto referência da classe, com base nos estudos que foram divulgados sobre sua possível eficácia no tratamento de COVID-19, um primeiro filtro foi aplicado, levando em consideração as afinidades de ligação obtidas do estudo de *docking* molecular. Os ligantes que apresentaram afinidade de ligação superiores ao valor obtido no *docking* molecular da NTZ com a proteína N ($-6,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) foram desconsiderados para as demais etapas da análise, uma vez que apresentaram uma menor interação com a proteína N, quando comparados com a NTZ.

Dessa forma, 44 ligantes (Tabela 3) foram selecionados para a próxima etapa da análise, que envolve a avaliação das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos.

Tabela 3. Compostos selecionados após análise da afinidade de ligação para estudo das propriedades ADMET

		ID				
NTZ	68	76	16	8	28	19
35	69	11	29	20	31	14
36	81	32	39	71	42	15
38	84	66	47	13	73	
41	85	4	48	45	82	
61	10	5	72	87	9	
67	18	12	7	17	2	

ID = número de identificação do ligante. Fonte: Elaborada pela própria autora.

5.3 ANÁLISE DO PERFIL FARMACOCINÉTICO E TOXICOLÓGICO

Nesta etapa do desenvolvimento do trabalho, as 44 estruturas selecionadas (Tabela 3) baseadas na afinidade de ligação e a nitazoxanida foram submetidas a análises das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas.

Foi realizado utilizando o servidor pkCSM uma análise da taxa de absorção intestinal (Tabela 4). O intestino é o principal local de absorção de medicamentos que são administrados por via oral. De acordo com os parâmetros do pkCSM, uma substância que apresenta resultado inferior a 30% é considerada mal absorvida. Dessa forma, apenas o composto com ID 8 não passa no teste de absorção intestinal.

O volume de distribuição de um fármaco diz respeito sobre o volume em que a substância precisa ser diluída e uniformemente distribuída para alcançar a concentração observada no plasma sanguíneo. Quanto maior for o volume de distribuição, indica que a droga é mais distribuída nos tecidos ao invés do plasma. Alguns fatores intrínsecos ao paciente podem afetar esse parâmetro, tais como desidratação e insuficiência renal. De acordo com os parâmetros de avaliação do pkCSM, o volume de distribuição é considerado baixo quando abaixo de 0,71 L / kg ($\log VD_{ss} < -0,15$) e alto quando acima de 2,81 L / kg ($\log VD_{ss} > 0,45$).

Foi realizada também uma análise com relação ao metabolismo dos compostos (Tabela 4). O citocromo P450 é responsável pelo metabolismo de muitos fármacos. Porém, inibidores de P450 pode modificar a farmacocinética dos fármacos. Assim, os parâmetros avaliados no pkCSM vão indicar se um determinado composto pode ser metabolizado pelo P450. São avaliadas as duas principais isoformas responsáveis pelo metabolismo, 2D6 e 3A4. Baseado nos resultados obtidos, os compostos com ID NTZ, 2, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 28, 35, 36, 39, 71, 72, 73, 82 e 87 são metabolizados por pelo menos uma das isoformas avaliadas e, portanto, podem sofrer modificações farmacocinéticas.

A Tabela 4 também apresenta os dados com relação a avaliação da excreção. Para isso o pkCSM realiza uma análise para definir se um determinado composto pode ser substrato do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2). O transportador OCT2 expresso no túbulo proximal dos rins, realiza a depuração de compostos endógenos e de diversos medicamentos utilizados na clínica. A avaliação quanto a capacidade de um composto ser ou não substrato do OCT2 diz respeito não só sobre sua eliminação, mas também como possíveis contraindicações, visto a possibilidade de haver interações adversas com outras substâncias coadministradas que também são substrato do mesmo transportador. Com relação a essa análise, nenhum dos compostos foi indicado como um substrato de OCT2.

A toxicidade dos compostos também foi amplamente avaliada. Utilizando o servidor pkCSM, foi realizado o teste de toxicidade de AMES. O teste de AMES utiliza linhagens de *Salmonella typhimurium* que são sensíveis a substâncias com potencial de provocar mutações. Através da contagem de colônias por placa torna possível estabelecer o potencial mutagênico de uma substância de acordo com sua concentração (MOREIRA *et al.*, 2002). Um teste positivo indica que o composto é mutagênico, podendo também vir a possuir efeito carcinogênico. Baseado nessa análise, apenas os compostos 32, 36, 38, 41, 61, 66, 67, 68, 69, 71, 72, 73, 81, 82, 84, 85 e 87 não foram considerados tóxicos.

O gene hERG é responsável pela codificação da subunidade responsável pela formação dos canais de potássio, importantes na etapa de repolarização cardíaca. A disfunção desse gene provoca prolongamento do intervalo QT e morte súbita, em pacientes com isquemia cardíaca. A inibição dos canais de potássio codificados pelo hERG leva ao desenvolvimento da síndrome do intervalo QT prolongado adquirido, causando arritmia ventricular fatal. A presença da inibição desse gene levou a retirada de diversas substâncias do mercado (LAMOTHE *et al.*, 2016). Os compostos que foram preditos positivos para esse teste foram descontinuados do estudo.

Algumas substâncias tem o potencial de provocar lesão hepática e isso acaba se tornando um fator limitante no desenvolvimento de fármacos. Algumas estratégias em tecnologia farmacêutica podem tornar algumas substâncias mais hepatotoleráveis, mais solúveis e melhorar a excreção (CHUNG; FERREIRA, 1999). De acordo com o pkCSM, um composto foi classificado como hepatotóxico caso apresentasse pelo menos um evento hepático fisiológico ou patológico que estivesse associado a disfunção normal do fígado.

Após a análise dessas propriedades consideradas relevantes, selecionamos os compostos com ID 32, 41, 67, 68, 69, 81, 84 e 85 para as próximas análises.

Tabela 4. Resultados das análises de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos 44 compostos selecionados utilizando o servidor pkCSM

ID	Absorção (%)	Distribuição (VD _{ss} , log L kg ⁻¹)	Metabolismo (substratos de CYP2D6/CYP3A4)	Excreção (OCT2 Renal)	Toxicidade de AMES	Inibidor de hERG I / hERG II	Hepatotoxicidade
NTZ	86,222	-0,799	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Sim
2	89,045	-0,258	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim
4	92,453	-0,542	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Sim
5	92,453	-0,542	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Sim
7	89,095	-0,466	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Não
8	0,840	-0,497	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Sim
9	84,868	-0,502	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Não
10	85,259	-0,500	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
11	82,924	-0,717	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
12	94,509	-0,731	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim
13	90,942	0,262	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Não
14	91,303	-0,335	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim
15	93,680	-0,534	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim
16	94,727	-0,465	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim
17	92,039	0,074	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Não
18	93,494	-0,507	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim

19	90,451	-0,640	Não/Sim	Não	Sim	Não/Sim	Sim
20	92,379	0,126	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
28	86,222	-0,799	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Sim
29	82,924	-0,717	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
31	83,392	-0,678	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
32	91,324	-0,113	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não
35	92,878	-0,698	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Sim
36	76,553	-0,884	Não/Sim	Não	Não	Não/Não	Sim
38	73,338	-0,680	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Sim
39	89,212	-0,651	Não/Sim	Não	Sim	Não/Não	Não
41	52,835	-1,360	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não
42	83,392	-0,678	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
45	82,185	-0,729	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
47	83,392	-0,678	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
48	83,392	-0,678	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
61	71,970	-0,919	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Sim
66	90,025	0,527	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não
67	90,025	0,527	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não
68	90,025	0,527	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não
69	92,066	0,054	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não

71	89,047	-0,409	Yes/Yes	Não	Não	Não/Sim	Não
72	90,462	-0,321	Não/Sim	Não	Não	Não/Sim	Não
73	89,894	-0,283	Não/Sim	Não	Não	Não/Sim	Não
76	87,964	-0,527	Não/Não	Não	Sim	Não/Não	Não
81	91,284	-0,502	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Não
82	90,665	-0,377	Não/Sim	Não	Não	Não/Sim	Não
84	73,255	-0,671	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Sim
85	73,338	-0,680	Não/Não	Não	Não	Não/Não	Sim
87	87,690	-0,498	Não/Sim	Não	Não	Não/Sim	Não

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Nenhuma das moléculas selecionadas apresentou qualquer alerta de risco toxicológico positivo. O OSIRIS Property Explorer avalia a probabilidade de existir efeitos mutagênicos, tumorigênicos, efeitos irritantes e efeitos reprodutivos, e os classifica como alto risco (vermelho), médio risco (amarelo) e baixo risco (verde). Todas as estruturas demonstraram alertas verdes, ou seja, apresentam baixo risco de possuírem algum efeito tóxico.

Em relação ao Drug-Likeness, valores positivos demonstram que a molécula possui predominância de fragmentos que estão frequentemente presentes em medicamentos comercializados, o que não significa, necessariamente, que esses fragmentos sejam de propriedades funcionais farmacologicamente ativas, mas já prevê a similaridade dos compostos com medicamentos comerciais. Resultados acima de 0 são desejáveis. Todas as estruturas apresentaram Drug-Likeness favorável, entre 0,5 e 3,5.

Já o Drug Score, outro parâmetro do servidor OSIRIS, combina os resultados de Drug-Likeness, cLogP, solubilidade, peso molecular e os riscos de toxicidade em um valor que pode ser utilizado para qualificar de forma geral um composto de acordo com seu potencial para se tornar um medicamento. Este parâmetro varia de 0 a 1. Todas as substâncias selecionadas apresentaram valores de Drug Score favoráveis: ID 32 = 0,7; ID 41 = 0,89; ID 67 = 0,74; ID 68 = 0,68; ID 69 = 0,87; ID 81 = 0,83; ID 84 = 0,88 e ID 85 = 0,84.

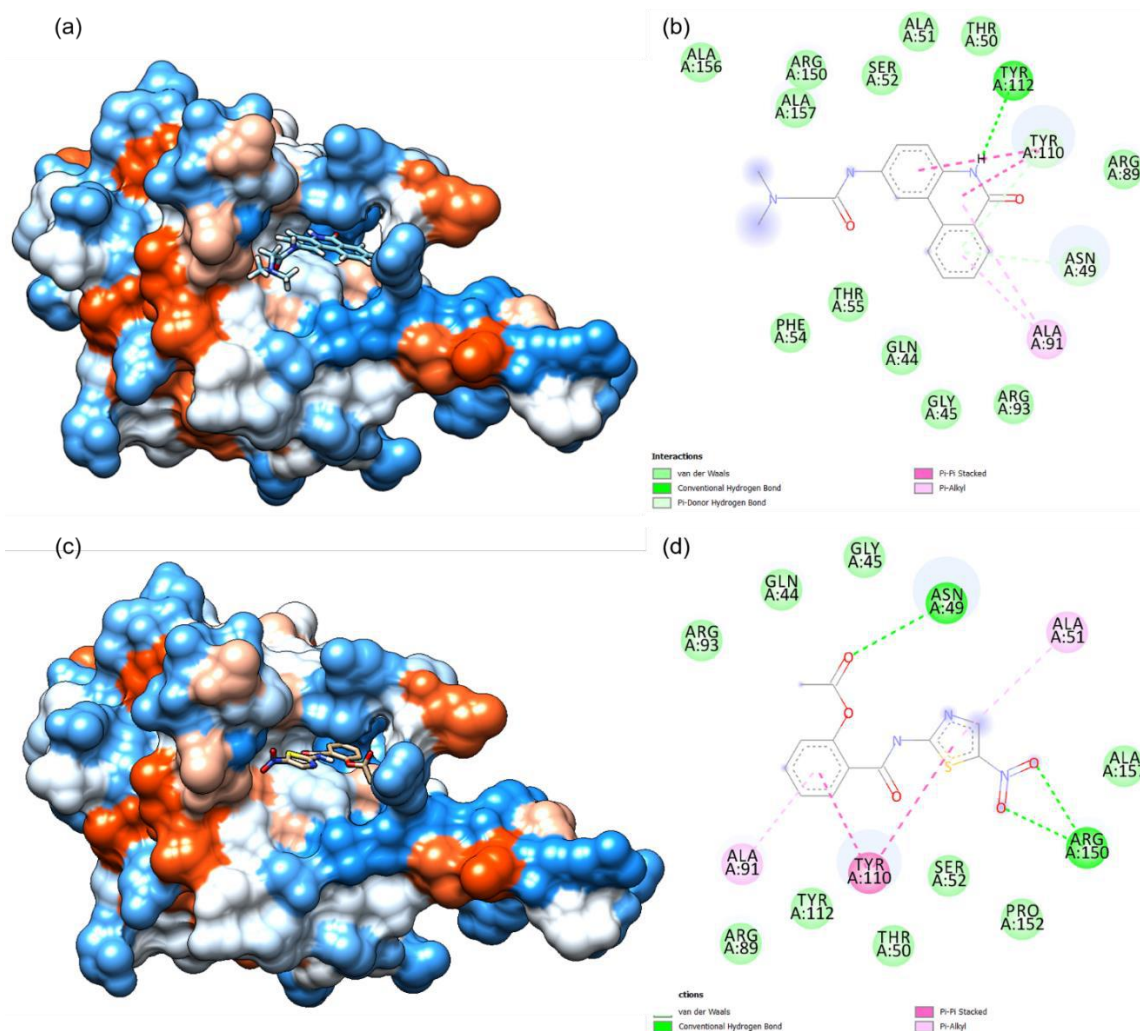
Logo, baseado no perfil ADMET dos compostos estudados, os compostos com ID 32, 41, 67, 68, 69, 81, 84 e 85 foram selecionados e uma análise mais detalhada das interações destes compostos com a proteína N será apresentada na próxima etapa.

5.4 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES LIGANTE-PROTEÍNA

Após os testes do perfil farmacocinético e toxicológico das substâncias em estudo, dos 88 compostos selecionados, apenas 8 foram selecionados nos testes realizados no trabalho, ID: 32, 41, 67, 68, 69, 81, 84 e 85. Para estes compostos finais, as interações que cada composto faz com o modelo construído da proteína N de SARS-CoV-2 foram avaliadas. Além disso, tendo em vista a elevada similaridade das proteínas N de SARS-CoV e SARS-CoV-2, foi realizado o docking molecular do

inibidor PJ34 (encontrado cocristalizado na proteína 4KXJ) com o modelo construído da proteína N de SARS-CoV-2. As interações encontradas do inibidor PJ34 foram usadas como referência na análise das interações da NTZ e dos 8 compostos selecionados com a proteína N de SARS-CoV-2.

Figura 12 – Interação do inibidor PJ34 e da nitazoxanida (NTZ) no sítio de ligação da proteína N. (a) Representação da superfície do sítio de ligação da proteína N no complexo PJ34@N-pro. (b) Mapa de interação 2D do inibidor PJ34 com a proteína N. (c) Representação da superfície do sítio de ligação da proteína N no complexo NTZ@N-pro. (d) Mapa de interação 2D da nitazoxanida com a proteína N



Fonte: Elaborada pela própria autora

A análise das interações ligante-proteína para o inibidor PJ34 com a proteína N (Figura 12b) mostram que o composto faz ligação de hidrogênio com o resíduo de

TYR112. Além disso, é observada uma interação π - π *stacking* com o resíduo de TYR110 e várias outras interações de van der Waals. Já para a nitazoxanida (Figura 12d), podem ser observadas ligações de hidrogênio com os resíduos ASN49 e ARG150 e várias interações não polares, com destaque para a interação π - π *stacking* do núcleo tiazol com o resíduo de TYR110 e a interação π -alquil do mesmo grupo com resíduo de ALA51.

As interações de Van der Waals são caracterizadas pela aproximação de moléculas com dipolos induzidos, resultado da flutuação da densidade eletrônica entre os grupos apolares da molécula. Na maioria dos casos, são interações de fraca energia (0,5-1,0 kcal.mol⁻¹), resultante da polarização das ligações entre C-H ou C-C. São ligações de extrema importância no reconhecimento do fármaco pelo sítio receptor, já que são caracterizadas por múltiplas interações, que somadas apresentam uma contribuição energética considerável (FRAGA, 2001). As interações hidrofóbicas presentes entre molécula e alvo, também são interações fracas, de cerca de ~1 kcal.mol⁻¹, resultante da interação em cadeias ou subunidades apolares. As estruturas apolares se encontram solvatadas por moléculas de água, que colapsam com a aproximação do ligante hidrofóbico possibilitando a interação entre ligante-receptor as custas do aumento da entropia do sistema provocada pela desorganização desse sistema (FRAGA, 2001). As ligações mais importantes existentes nos sistemas biológicos são as ligações de hidrogênio. Estas se caracterizam pela interação entre heteroátomos eletronegativos, como oxigênio, nitrogênio, enxofre, e o átomo de hidrogênio de ligações O-H, N-H e CF₂-H.

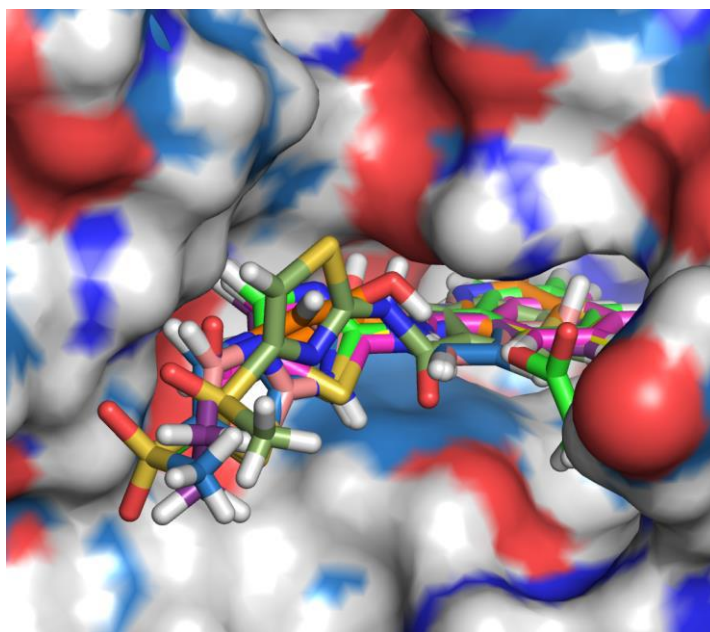
Os 8 ligantes selecionados tiveram um perfil de interação bem similar entre si com a proteína N de SARS-CoV-2 (Figura 13). As interações observadas pelos 8 ligantes selecionados com a proteína N também foram analisadas (Figura 14) e comparadas com o perfil exibido de interação do inibidor PJ34 e da nitazoxanida com a proteína N de SARS-CoV-2. Assim como o inibidor PJ34 e ao contrário da NTZ, os 8 ligantes selecionados apresentaram ligação de hidrogênio com o resíduo TYR112. Além disso, outras ligações de hidrogênio também foram observadas para todos os ligantes, exceto o ligante com ID 67. A seguir são listadas as demais ligações de hidrogênio observadas por cada ligante: ID 32 – ASN49, ID 85 – SER52, ARG150 e ALA157, ID 68 – THR50 e SER52, ID 69 – SER52, ID81 – ARG150, ID 84 – ASN49 e ARG150 e ID 41 – ARG150. Os resíduos de SER52 e ARG150, assim como o TYR112

foram os que apresentaram um maior número de ligações de hidrogênio com os ligantes, destacando-se o ligante com ID 85 que além de apresentar ligações de hidrogênio com os 3 resíduos, também apresentou como o resíduo de ALA157.

Quando as demais interações não polares são consideradas, destaca-se a interação π - π *stacking* do núcleo tiazol de todos os ligantes com o resíduo de TYR110. Além disso, várias outras interações de van der Waals também são observadas para os ligantes selecionadas e para os compostos de referência (PJ34 e NTZ).

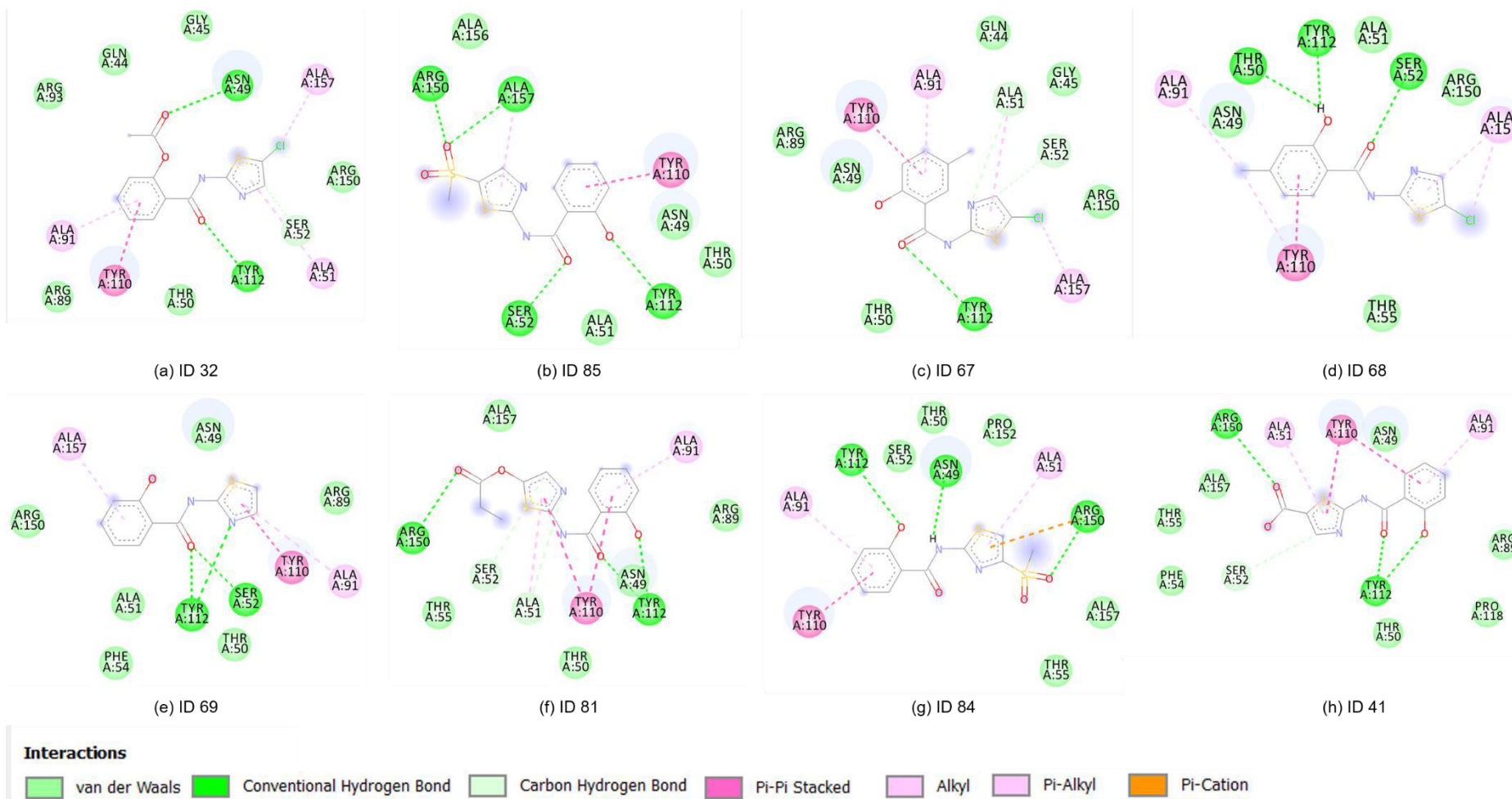
A análise das interações dos ligantes com a proteína N de SARS-CoV-2 mostram que com exceção do ligante com ID 67, os demais 7 ligantes selecionadas apresentam um maior perfil de interação com a proteína N em relação aos compostos de referência, PJ34 que apresenta descrito na literatura inibição da proteína N de SARS-CoV e nitazoxanida que apresenta atividade biológica *in vitro* contra o vírus SARS-CoV-2. Logo os 8 compostos, ID 32, 41, 67, 68, 69, 81, 84 e 85 serão submetidos posteriormente a simulações de dinâmica molecular de forma a avaliar as energias de ligação com a proteína N de SARS-Cov-2, para que sejam determinados os compostos com perfil mais adequado para serem avaliados *in vitro* contra o vírus SARS-CoV-2.

Figura 13 – Representação da superfície do sítio de ligação da proteína N com os 8 ligantes selecionados no estudo. As cores dos ligantes indicam: verde (ID 32), amarelo (ID 41), pink (ID 67), laranja (ID 68), rosa (ID 69), violeta (ID 81), azul (ID 84) e bege (ID 85)



Fonte: Elaborada pela própria autora

Figura 14 – Mapa de interação 2D dos ligantes selecionados após as análises realizadas com a proteína N de SARS-CoV-2



Fonte: Elaborada pela própria autora

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou uma avaliação *in silico* da interação de 88 tiazóis com a proteína N de SARS-CoV-2, vírus responsável pela pandemia da COVID-19. A afinidade de ligação dos 88 tiazóis foi comparada com a encontrada pela nitazoxanida, tiazol relatado na literatura como potencial inibidor do vírus SARS-CoV-2. Após essa triagem inicial, 44 compostos foram selecionados e tiveram seu perfil farmacocinético e toxicológico avaliado, onde 8 compostos apresentaram resultados mais promissores nessa análise.

Os 8 compostos selecionados, ID 32, 41, 67, 68, 69, 81, 84 e 85, tiveram suas interações com a proteína N de SARS-CoV-2 avaliadas, onde foi observada uma ligação de hidrogênio com o resíduo de TYR112 e uma interação π - π *stacking* do núcleo tiazol com o resíduo de TYR110. Além disso, com exceção do composto com ID 67 que apresenta um perfil de interação similar ao observado pelos compostos de referência estudados (PJ34 e nitazoxanida), os demais compostos apresentam um maior perfil de interação com a proteína N.

No geral, o trabalho apresentou 8 compostos que se apresentam como potenciais inibidores da proteína N de SARS-CoV-2, que devem ter sua energia de ligação em condições termodinâmicas com a proteína N de SARS-CoV-2 avaliada e, posteriormente, submetidos a testes biológicos.

REFERÊNCIAS

ACCINELLI, R. A.; PORTMANN-BARACCO, A.; BRYCE-ALBERTI, M. Antiviral and anti-inflammatory properties of ivermectin and its potential use in COVID-19. **Archivos de Bronconeumologia**, v. 56, n. 12, p. 831, 2020.

ALBUQUERQUE, L. P.; SILVA, R. B.; ARAÚJO, M. R. S. Covid-19: Origem, Patogênese, Transmissão, Aspectos Clínicos e Atuais Estratégias Terapêuticas. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 6, n. 10432, 2020. Disponível em: <https://www.ojs.ufpi.br/index.php/nupcis/article/view/10432>.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/anvisa-aprova-registro-da-vacina-da-fiocruz-astrazeneca-e-de-medicamento-contr-o-coronavirus/ApresentaoRendesevirSeguranaeEficcia.pdf/view>. Acesso em 11 de abril de 2021.

BARLOW, A. *et al.* Review of Emerging Pharmacotherapy for the Treatment of Coronavirus Disease 2019. **Pharmacotherapy**, v. 40, n. 5, p. 416-437, 2020.

CAO, X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 5, p. 269–270, 2020.

CHAN-BACAB, M. J.; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G. Nitazoxanide, tizoxanide and a new analogue [4-nitro-N-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)benzamide; NTB] inhibit the growth of kinetoplastid parasites (*Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*) in vitro. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 1292–1293, 2008.

CHAN, J. F. *et al.* Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 540, 2020.

CHANG, C. *et al.* Crystal structure of RNA binding domain of nucleocapsid phosphoprotein from SARS coronavirus 2. To be published. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/6VYO>.

CHARY, M. A. *et al.* COVID-19: Therapeutics and Their Toxicities. **Journal of Medical Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 284-294, 2020.

CHU, C. M. *et al.* Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: Initial virological and clinical findings. **Thorax**, v. 59, n. 3, p. 252–256, 2004.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 75–84, 1999.

CORTES, H. *et al.* In vitro efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells.

Parasitology, v. 134, p. 975–985, 2007.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, 2019.

ECONOMIA, M. DA. FAVIPIRAVIR: Tratamento da COVID-19 e Pedidos de Patentes Depositados no INPI. *Observatório de Tecnologias Associadas à COVID-19*, 2020.

ESPOSITO, M.; MU, N.; HEMPHILL, A. Structure-activity relationships from in vitro efficacies of the thiazolide series against the intracellular apicomplexan protozoan *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 183–190, 2007.

EUROFARMA. Astro® (azitromicina di-hidratada). *Bula para Profissional de Saúde*, [S.d.].

FERREIRA, L. G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FISER, A.; DO, R. K.; SALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein Science**, v. 9, n. 9, p. 1753-1773, 2000.

FRAGA, C. A. M. Razoes da Atividade Biológica: Interações Micro- e Biomacromoléculas. **Química Nova na Escola**, v. 3, p. 33–42, 2001.

GHAZY, R. M. *et al.* A systematic review and meta-analysis on chloroquine and hydroxychloroquine as monotherapy or combined with azithromycin in COVID-19 treatment. **Scientific Reports**, v. 10, p. 22139, 2020.

GUERRA, R. F. **Modelagem Molecular Voltada Para a Construção De Um Nanobiossensor Para Detecção Do Herbicida Imazaquin**. Uberlândia, 2016. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, p. 98, 2016.

GUO, Y. R. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- An update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2020.

GUPTA, D.; SAHOO, A. K.; SINGH, A. Ivermectin: potential candidate for the treatment of Covid 19. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 369–371, 2020.

HANWELL *et al.*, Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, p. 17, 2012.

HEIDARY, F.; GHAREBAGHI, R. Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. **Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 9, p. 593–602, 2020.

- HELMY, Y. A. *et al.* The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1225, 2020.
- HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.
- JASENOSKY, L. D. *et al.* The FDA-Approved Oral Drug Nitazoxanide Amplifies Host Antiviral Responses and Inhibits Ebola Virus. **iScience**, v. 19, p. 1279–1290, 2019.
- KANG, S. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. **Acta Pharmaceutica B**, v. 10, n. 7, p. 1228-1238, 2020.
- KERETSU, S.; BHUJBAL, S. P.; CHO, S. J. Rational approach toward COVID-19 main protease inhibitors via molecular docking, molecular dynamics simulation and free energy calculation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.
- LAMOTHE, S. M. *et al.* The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) potassium channel represents an unusual target for protease-mediated damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 39, p. 20387–20401, 2016.
- LEELANANDA, S. P.; LINDERT, S. Computational methods in drug discovery. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 12, p. 2694–2718, 2016.
- LI, J. Y. *et al.* The epidemic of 2019-novel-coronavirus (2019-nCoV) pneumonia and insights for emerging infectious diseases in the future. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 2, p. 80–85, 2020.
- LIN, S.-Y. *et al.* Structural basis for the identification of the N-Terminal domain of coronavirus nucleocapsid protein as an antiviral target. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2247-2257, 2014.
- LIU, T. *et al.* Cathepsin L-selective inhibitors: A potentially promising treatment for COVID-19 patients. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 213, p. 107587, 2020.
- MARTI-RENOM, M. A. *et al.* Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, p. 291-325, 2000.
- MONAJJEMI, M.; MOLLAAMIN, F.; SHOJAEI, S. An overview on coronaviruses family from past to COVID-19: Introduce some inhibitors as antiviruses from Gillan's plants. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 5575–5585, 2020.
- MOREIRA, R. R. D. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 11–19, 2002.

- NEESE, F. Software update: The ORCA program system, version 4.0. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 8, p. e1327, 2018.
- NITULESCU, G. M. *et al.* Comprehensive analysis of drugs to treat SARS-CoV-2 infection: Mechanistic insights into current COVID-19 therapies. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 46, p. 467-488, 2020.
- PAHO: Pan American Health Organization. **Ongoing Living Update of COVID-19 Therapeutic Options - Summary of Evidence**, 2021. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52719/PAHOIMSEIHCOVID-19210007_eng.pdf?sequence=33&isAllowed=y
- PEPPERRELL, T. Review of safety and minimum pricing of nitazoxanide for potential treatment of COVID-19. **Journal of Virus Eradication**, v. 6, p. 52-60, 2020.
- PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.
- RAMESHRAD, M. *et al.* A comprehensive review on drug repositioning against coronavirus disease 2019 (COVID19). **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 2019, p. 1–16, 2020.
- ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 3, p. 227–230, 2016.
- ROSSIGNOL, J. F. Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. **Antiviral Research**, v. 110, p. 94–103, 2014.
- SÁ, É. R. A. DE *et al.* Introduction to Computational Quantum Calculations in Ionic and Molecular Systems. **RCT - Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 6, n. 0, 2020.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, p. 779-815, 1993.
- SANG, P. *et al.* Anti-HIV drug repurposing against SARS-CoV-2. **RSC Advances**, v. 10, n. 27, p. 15775–15783, 2020.
- SCIOR, T. *et al.* Antiprotozoal Nitazoxanide Derivatives: Synthesis, Bioassays and QSAR Study Combined with Docking for Mechanistic Insight. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 11, p. 21–31, 2015.
- SHEREEN, M. A. *et al.* COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 91–98, 2020.
- SILVA, V. B. **Estudo de modelagem molecular e relação estrutural atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. São Paulo, 2009. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São

Paulo, p. 149, 2009.

SINGH, S.; FLOREZ, H. Coronavirus disease 2019 drug discovery through molecular docking. **F1000Research**, v. 9, p. 502, 2020.

STACHULSKI, A. V. *et al.* Thiazolides as Novel Antiviral Agents. 1. Inhibition of Hepatitis B Virus Replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4119–4132, 2011a.

STACHULSKI, A. V. *et al.* Thiazolides as Novel Antiviral Agents. 2. Inhibition of Hepatitis C Virus Replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 8670-8680, 2011b.

STACHULSKI, A. V. *et al.* Second-generation nitazoxanide derivatives: thiazolides are effective inhibitors of the influenza A virus. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 851-862, 2018.

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.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, p. 5.6.1-5.6.37, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <https://covid19.who.int/table>. Acesso em: 08 de Abr. de 2021.

YANG, L. *et al.* COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 2020.

YASMIN, F. *et al.* Antiviral Activity of Thiazolide Derivatives Against Dengue Virus in Huh-7 Cell Line. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 11, n. 2, p. e62467, 2018.

YUKI, K.; FUJIOGI, M.; KOUTSOGIANNAKI, S. COVID-19 pathophysiology: A review. **Clinical Immunology**, v. 215, p. 108427, 2020.

ZENG, W. *et al.* Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623, 2020.

ZHANG, J. *et al.* Teicoplanin potently blocks the cell entry of 2019-nCoV. **bioRxiv 2020.02.05.935387**, 2020.

ZHAO, L. *et al.* Development of Novel Anti-influenza Thiazolides with Relatively Broad-spectrum Antiviral Potentials. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 7, p. e00222-20, 2020.