

PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS CONTRA COVID-19: UMA EXPERIÊNCIA DE ENSINO REMOTO DE QUÍMICA FARMACÊUTICA

Rhanna Victória Amaral da Silva^{a,*}, Larissa Magno Monteiro^a, Carlos Henrique Lamego Guimarães Thomaz Branco^a e Fernanda Guillhon-Simplicio^a

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 69080-900 Manaus – AM, Brasil

Recebido em 12/08/2022; aceito em 22/11/2022; publicado na web 03/02/2023

DRUG DESIGN AGAINST COVID-19: A REMOTE TEACHING EXPERIENCE IN PHARMACEUTICAL CHEMISTRY. In front of the difficulties faced in making a new drug available to the population, it is essential to seek ways to simplify the process. *In silico* methodologies are alternatives to benchtop experiments, being frequently used due to their speed and low cost. The present study aimed to formulate a theoretical-practical activity in the Pharmaceutical Chemistry course, where students applied their knowledge of structural modeling and molecular docking to propose bioactive compounds against molecular targets of the SARS-CoV-2 virus. The class was divided, and each group presented a drug candidate, the precursors being natural molecules. In total, seven derivatives were designed and tested against different macromolecules, and then an *in silico* prediction of their physicochemical characteristics was performed. The docking results were positive for all derivatives, in terms of binding energy, mainly GEND with -9.0 kcal mol⁻¹. In addition, the prototypes exhibited good interactions with the amino acids of the respective targets, mainly KAED, QUED and GEND, in addition to presenting adequate physicochemical properties for meeting the Lipinski restrictions. Therefore, this study presented at least three potential inhibitors of SARS-CoV-2, showing the importance of using computational tools in drug design and development, as well as in teaching practice.

Keywords: molecular docking; drug design; medicinal chemistry; SARS-CoV-2.

INTRODUÇÃO

Diante do cenário pandêmico que se estabeleceu no final de 2019, o uso de ferramentas computacionais, tais como triagem de alto rendimento, cristalografia de raio-X e química combinatória,¹ vem sendo grandes aliadas na continuidade de pesquisas científicas e no processo de ensino-aprendizagem nas universidades, com o emprego de aulas práticas experimentais envolvendo modelos de síntese, análises de predições de propriedades farmacológicas e triagem de fármacos por ferramentas computacionais.²⁻³

O emprego dessas ferramentas permite estudos mais detalhados da relação estrutura-atividade, dados de farmacodinâmica e propriedades farmacocinéticas, que proporcionam uma compreensão mais abrangente dos aspectos do reconhecimento intermolecular.^{4,5}

O *docking* molecular é baseado na afinidade de ligação entre um possível ligante obtido a partir de um protótipo e um alvo molecular (receptor, enzima). Assim, esse método é capaz de prever a interação, energia de ligação, além de caracterizar os modos de ligação. Compreende duas etapas básicas que envolvem a previsão da conformação e orientação do ligante (pose) e avaliação da afinidade de ligação, que permitem inclusive, planejar novos derivados com base nos resultados dessas análises, com base na estrutura do ligante ou do receptor.^{6,7}

Durante as últimas décadas muitos softwares foram desenvolvidos para a análise de moléculas candidatas a fármacos por *docking* molecular. Dentre os mais utilizados estão o AutoDock, GOLD, AutoDock Vina, DockThor, OURO, FlexX e Molegro Virtual Docker.⁸ Outros programas de visualização podem ser usados durante o processo para análise dos resultados tais como Pymol, Quimera UCS, VMD e Discovery Studio. Muitos desses programas estão disponíveis para uso educacional de forma gratuita, e permitem um treinamento relativamente rápido acerca de suas principais funcionalidades

(fácil manuseio pelo usuário), e são compatíveis com a maioria dos sistemas operacionais, incluindo Windows®, utilizado pela maioria dos estudantes.

Este texto relata a experiência de planejamento e aplicação de uma aula prática remota de Química Farmacêutica no curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas, campus Manaus, onde os estudantes empregaram o *docking* molecular para criar e defender um candidato a fármaco que atuasse no tratamento ou prevenção da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, fomentando o debate sobre o papel da Universidade na resolução de problemas imediatos da sociedade, estimulando a criatividade e o senso crítico dos mesmos.

PARTE EXPERIMENTAL

Planejamento da aula

Essa aula foi realizada com estudantes do curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas matriculados na disciplina de Química Farmacêutica no período 2020/1 (ano civil 2021). Dado o cenário de pandemia, a disciplina foi ministrada de modo remoto e, nesses termos, a professora responsável demandou um projeto final onde os estudantes deveriam propor uma nova molécula com potencial contra SARS-CoV-2 ou COVID-19. Os estudantes deveriam defender a molécula proposta com base em revisão bibliográfica e os resultados do *docking* molecular, aplicando os conceitos aprendidos ao longo da disciplina Química Farmacêutica de forma ativa e integrada, diante de uma banca de professores da química medicinal e farmacologia.

Para tanto, os estudantes foram divididos em trios. O projeto teve como regras gerais:

1. A escolha do alvo molecular foi livre dentro do tema, e deveria ser embasada na bioquímica e/ou fisiopatologia da COVID-19, desde que nenhuma molécula-base se repetisse entre as equipes;

*e-mail: rhana2011@gmail.com

2. Obrigatoriamente, o alvo escolhido deveria possibilitar estudo de *docking* molecular (ter estrutura tridimensional depositada no *Protein Data Bank* – PDB)
3. A molécula proposta deveria ser inédita e não poderia ser oriunda de modificações moleculares de fármacos já existentes e nem de reposicionamento de fármacos;
4. Era recomendado que a molécula proposta fosse semissintética, com a escolha da molécula-base fundamentada em relação estrutura-atividade, valorizando, preferencialmente, produtos naturais amazônicos;
5. Caso fosse síntese total, a equipe deveria justificar a escolha;
6. A molécula proposta deveria obedecer aos critérios de Lipinski;
7. Todas as modificações realizadas deveriam ser justificadas com base na relação estrutura-atividade e os estudos de *docking* molecular;
8. Mostrar que tipo de reação daria origem a cada modificação proposta, assim como o nome correto dos grupamentos;
9. A molécula proposta deveria fazer, no mínimo, uma interação específica com o alvo (ligação covalente, interação iônica, ligação de hidrogênio);
10. A energia de interação tinha que ser menor ou igual a do fármaco e/ou molécula utilizados como padrão do *docking* com o alvo escolhido.

Antes de iniciarem os projetos, os estudantes tiveram aulas práticas síncronas e assíncronas mostrando os fundamentos de *docking* molecular de diferentes classes terapêuticas, e as gravações das aulas, além de tutoriais pré-gravados, os quais estão disponíveis como Material Suplementar deste texto, foram disponibilizados na sala virtual da disciplina. Os estudantes tiveram 30 dias para preparar suas defesas, período no qual receberam o suporte dos monitores, pós-graduandos em estágio à docência e da professora da disciplina, os quais acompanharam as equipes em interações síncronas para sanar dúvidas e ajudar com questões técnicas dos softwares utilizados.

As defesas foram síncronas, e apenas um dos membros de cada trio foi responsável pela apresentação, o qual foi definido em sorteio instantes antes da respectiva defesa. Cada equipe tinha o mínimo de 30 e o máximo de 45 minutos para apresentar todos os elementos solicitados e defender sua proposta, devendo destacar o processo criativo que levou à molécula final. Ao fim da exposição, as equipes foram arguidas por uma banca avaliadora de três membros, que fazia questões abertas dentro de suas especialidades e relacionadas ao trabalho apresentado. Nessa fase de arguição, todos os membros do trio poderiam interagir com a banca.

Programas utilizados

Para o cumprimento da atividade proposta, os estudantes foram orientados a fazer uso dos softwares que estão listados no Quadro 1. Além dos tutoriais sobre o uso dos softwares ministrados

pelos professores e monitores, os estudantes também poderiam consultar as indicações dos desenvolvedores dos programas e vídeos educativos confiáveis que estão dispostos em algumas plataformas da internet.

Obtenção do alvo e desenho dos ligantes

As etapas iniciais da prática consistiram na determinação do alvo proteico e sua obtenção no banco de dados de proteínas (PDB). A busca foi feita por meio do nome da proteína ou pelo código de quatro caracteres que esta recebe ao ser inserida no PDB. Alguns aspectos foram considerados durante a seleção dos alvos, como alta resolução, isto é, abaixo de 2 Å. No entanto, como alguns alvos não atenderam a este quesito no banco de dados, valores superiores foram aceitos. Também foram priorizadas proteínas co-cristalizadas com moléculas inibidoras. O download das estruturas cristalográficas foi feito no formato pdb.

Após determinação do alvo e estudo da relação estrutura-atividade, os estudantes escolheram uma molécula com potencial atividade contra o alvo. Empregando o ChemSketch, realizaram modificações moleculares visando a otimização destas estruturas. Os derivados desenhados foram salvos no formato mol2 e posteriormente transformados no formato pdb com o auxílio do programa Avogadro, onde tiveram suas energias minimizadas no campo de força *Universal Force Field* (UFF).

Preparo do alvo e ligante

As proteínas determinadas como alvos moleculares foram preparadas a partir do programa AutoDock Tools a fim de remover cofatores de cristalização e moléculas de água, adicionar os átomos de hidrogênio subtraídos e cargas atômicas, se necessário. Os ligantes também foram preparados para realização das etapas seguintes, podendo também ser adicionadas cargas e átomos caso houvesse necessidade. Tanto o alvo quanto os análogos foram salvos no formato pdbqt para realização da etapa de *docking* molecular.

Definição dos parâmetros do *docking*

Outra etapa de pré-ancoramento consistiu na definição dos espaços de busca e local de ligação do derivado ao receptor. Os parâmetros de gridbox no AutoDock Tools foram definidos englobando inteiramente ou parcialmente o receptor a fim de incluir o sítio de ligação deste alvo. Informações acerca dos aminoácidos que compõem o sítio ativo das enzimas foram localizadas nos artigos anexados nos bancos de dados de proteínas ou em outros estudos presentes na literatura. Além disso, os parâmetros da caixa também levaram em consideração os aminoácidos que circundavam a molécula inibidora co-cristalizada com a proteína (Figura 1) puderam ser determinados, anotados e posteriormente usados na etapa de *docking*.

Quadro 1. Conjunto de softwares empregados pelos graduandos

Programa	Etapas	Link de acesso
ChemSketch	Desenho dos ligantes	https://www.acdlabs.com/resources/free-chemistry-software-apps/chemsketch-freeware/
Avogadro	Minimização da energia de ligação dos ligantes	https://sourceforge.net/projects/avogadro/files/lat
AutoDock Tools	Preparo do alvo molecular e dos ligantes	https://ccsb.scripps.edu/mgltools/downloads/
AutoDock Vina	<i>Docking</i> molecular	https://vina.scripps.edu/downloads/
Discovery Studio	Análise bidimensional das interações intermoleculares, cálculo do RMSD	https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download
SwissADME	Predição das características físico-químicas	http://www.swissadme.ch/index.php

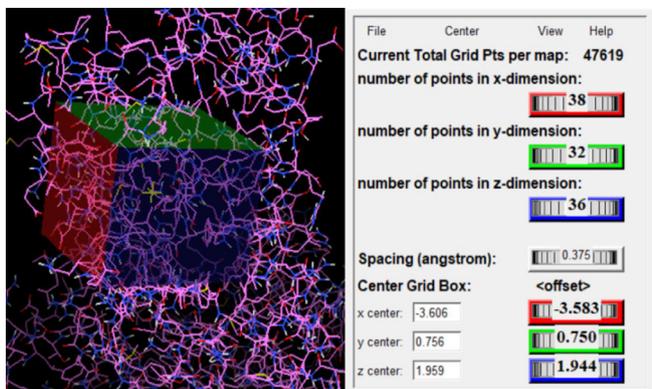


Figura 1. Definição dos parâmetros de caixa de uma enzima no programa AutoDock Tools

Validação

A etapa de validação do método de modelagem escolhido consiste na retirada do ligante da estrutura cristalográfica, reinserindo-o a partir da metodologia de *docking* utilizada, processo também denominado como *redocking*. Dessa forma, a posição do ligante co-cristalizado com proteína é comparada com a posição do mesmo ligante após separação da macromolécula e reintrodução para realização da *docking* molecular. Assim, o *redocking* visa garantir a predição correta da disposição do ligante em seu sítio de ligação na proteína. A validação do teste é confirmada quando a Raiz Quadrada do Desvio Quadrático Médio (*Root Mean Square Deviation* - RMSD) entre a pose obtida pelo *redocking* e a pose original for menor que $2,0 \text{ \AA}$.⁹ As etapas que envolvem a preparação do alvo, separação do ligante e *docking* molecular foram realizadas empregando o AutoDock Tools.

A determinação do RMSD foi feita utilizando o programa Discovery Studio. Para isto, a proteína juntamente com a molécula co-cristalizada, foram inseridas no software e, em seguida, a pose obtida pelo *redocking* foi adicionada de modo a sobrepor o ligante. Ao ocultar o alvo e selecionar os dois ligantes, acionou-se o recurso *Structure > RMSD > Heavy Atoms* e o valor de RMSD foi gerado automaticamente.

Docking molecular

Após preparo do alvo e do ligante e determinação dos parâmetros de caixa foi realizado o *docking* molecular, baseado na complementaridade do ligante-receptor. O *docking* do ligante ao alvo molecular foi realizado utilizando o programa AutoDock Vina e os procedimentos para realização desta etapa, bem como os códigos de comando utilizados, estão disponíveis no Material Suplementar.

De forma geral, para realização do *docking*, alguns arquivos são necessários para o funcionamento correto da metodologia no software, e devem estar devidamente organizados em uma pasta. Nessa pasta foram inseridos os alvos e os ligantes no formato *pdbqt* e os arquivos de programa *Vina* e *Vina split* no formato *exe*. Além disso, um arquivo de texto no formato *txt* para configuração foi criado contendo o nome da proteína e da molécula testada, assim como as dimensões da caixa, e posteriormente adicionado à pasta.

Assim, com o auxílio do *prompt* de comando (Windows®), o *docking* pôde ser concluído e os resultados apareceram na tela de comando, organizados de acordo com as melhores poses, classificadas pela energia de ligação.

Avaliação dos resultados

Os resultados a serem interpretados incluem os valores de RMSD

encontrados na etapa de validação, visualização dos sítios de ligação, além dos resultados de *docking* no AutoDock Vina, disponíveis em energia de ligação, tendo em vista que quanto menor a energia de ligação, maior é a afinidade da ligação e maior o potencial do ligante testado.

Além disso, os resultados obtidos no que se refere às interações entre ligante e receptor puderam ser visualizados pelos estudantes através do programa Discovery Studio. Para isto, o alvo foi inserido no programa e definido como receptor. Em seguida, a melhor pose do *docking* foi selecionada, adicionada ao software e definida como ligante. Após isto, os estudantes utilizaram o recurso *Ligand Interactions > Show 2D Diagram* e puderam identificar a presença de ligações hidrofóbicas, de hidrogênio ou desfavoráveis de acordo com os resultados obtidos em cada teste.

Análise das propriedades físico-químicas

Para a análise das propriedades físico-químicas das moléculas propostas pelos estudantes foi utilizada a plataforma SwissADME, uma ferramenta gratuita e online que permite avaliar aspectos farmacocinéticos de pequenas moléculas, incluindo a análise da Regra de Lipinski (*Rule of five*) e suas extensões. Para isto, os estudantes desenharam as estruturas químicas propostas na plataforma, e os parâmetros de interesse foram calculados em poucos minutos. Os parâmetros físico-químicos analisados segundo a regra dos cinco de Lipinski são: $\text{LogP} < 5$; peso molecular $< 500 \text{ Da}$; grupos doadores de ligação de hidrogênio < 5 ; grupos aceptores de ligação de hidrogênio < 10 que, de acordo com o autor, são as propriedades mínimas desejáveis em uma molécula proposta como potencial fármaco de uso oral, pois as Regras de Lipinski e suas extensões estão relacionadas a capacidade da molécula em permear membranas e, conseqüentemente, ser bem absorvida pelo TGI (trato gastro intestinal), apresentando possivelmente, boa biodisponibilidade oral.¹⁰

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O roteiro prático criado para desenvolvimento da aula de dinâmica molecular possibilitou aos estudantes a visualização das etapas de *docking* para proposição e melhoria da afinidade de ligantes frente a um alvo específico, além da inspeção visual de complexos 3D entre o alvo-receptor. A prática demonstrou ainda o potencial do uso de ferramentas computacionais no processo de aprendizagem de estudantes no ensino da química medicinal, abrangendo de forma satisfatória o caráter multidisciplinar da disciplina

Após a aula experimental, foi proposto que os grupos realizassem o *docking* molecular com um potencial fármaco para atuar na COVID-19. Nesse sentido, os estudantes elaboraram seus ligantes a partir de uma substância natural e as modificações realizadas foram feitas seguindo reações gerais em química orgânica.¹¹

Para os derivados ESPD e CELD, o isosterismo clássico foi aplicado, resultando na substituição de grupamentos metil por hidroxilas. De forma semelhante, as moléculas KAED e QUED também foram concebidas. Para KAED as modificações consistiram na substituição do átomo de hidrogênio pelo grupamento metoxi e adição de hidroxibenzeno no anel aromático, enquanto que para QUED foi realizada a adição dos grupamentos isopropil e resorcinol.

Ademais, utilizando a simplificação molecular, foi possível obter CURD a partir da Curcumina, mantendo os dois anéis aromáticos com hidroxilas em suas extremidades ligados por uma cadeia de carbonos com pelo menos uma insaturação e grupamentos cetona. Para a obtenção de GEND também se aplicou a simplificação molecular, reduzindo o esqueleto base do geniposídeo, o que resultou em uma estrutura que posteriormente foi unida, por meio

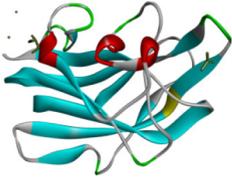
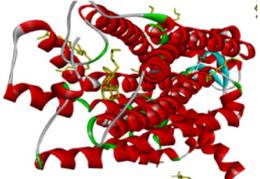
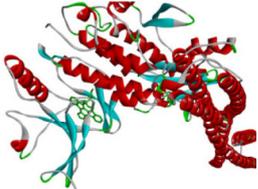
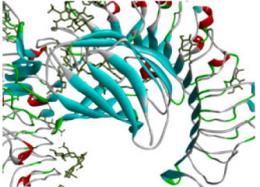
da hibridação molecular, a um grupamento volumoso. Ainda, o desenho de NAFD também envolveu o emprego de duas táticas do planejamento racional. Para obtenção de 1,4-dihidroxi-naftaleno-2,3-diona empregou-se o isosterismo clássico, substituindo átomos de hidrogênio por hidroxilas. Por fim, pode-se unir esta molécula ao ácido xantina-8-carboxílico através da hibridação molecular.

Além disso, cada grupo teve que selecionar um alvo diferente para a realização dos procedimentos de *docking*. Ao final obteve-se um total de sete alvos selecionados e as principais características de cada proteína estão indicadas na Tabela 1. Para apresentação dos resultados, os estudantes precisaram demonstrar os modelos tridimensionais das enzimas, as interações dos ligantes nativos com o alvo, os valores de

energia de ligação por *docking* molecular, além das interações dos ligantes modificados, a predição de propriedades físico-químicas e a relação de estrutura-atividade.

As enzimas obtidas do PDB foram avaliadas no programa Discovery Studio para inspeção do sítio ativo e visualização do complexo formado pela enzima e pelo ligante co-cristalizado. É possível ainda observar as especificações estruturais de cada enzima, quanto ao seu tamanho formato e complexidade. A resolução das enzimas selecionadas pelos grupos variou entre 1,73 Å e 3,10 Å, todas obtidas por difração de raio-X. Todas as enzimas selecionadas para o *docking* foram testadas em estudos anteriores para investigação de potenciais novos fármacos para atuar na COVID-19.

Tabela 1. Proteínas selecionadas pelos alunos de Química Farmacêutica, da Universidade Federal do Amazonas, para elaborar seu projeto de desenvolvimento de moléculas contra COVID-19

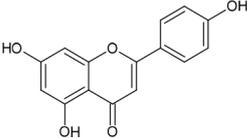
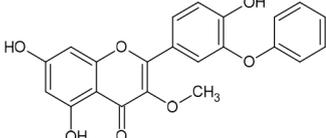
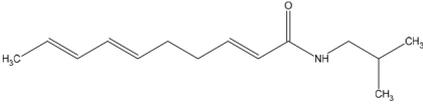
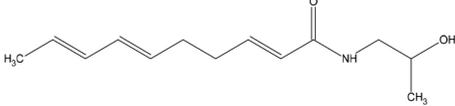
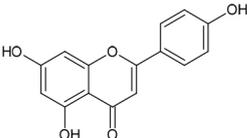
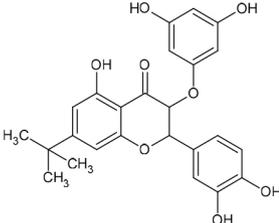
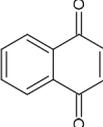
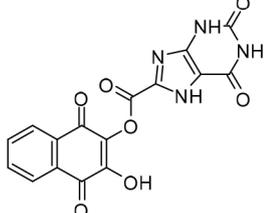
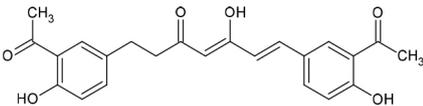
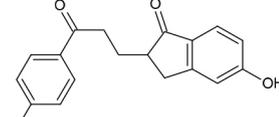
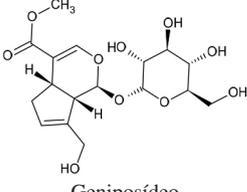
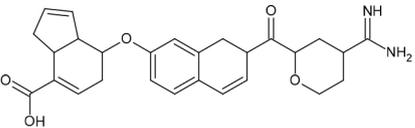
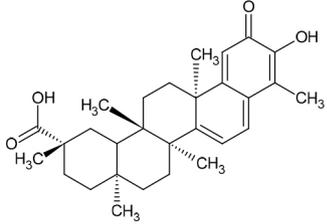
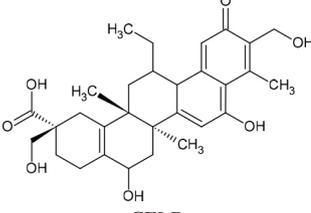
Proteína	Estrutura 3D	Código PDB	Resolução	Método de obtenção
Neuropilina-1		4RN5	1,73 Å	Difração de Raio-X
Receptor canabioide tipo II		5ZTY	2,80 Å	Difração de Raio-X
3CLpro/Mpro		6Y2E	1,75 Å	Difração de Raio-X
NSP 9		6W9Q	2,05 Å	Difração de Raio-X
NF-kB quinase		4KIK	2,83 Å	Difração de Raio-X
TMPRSS2		7MEQ	1,95 Å	Difração de Raio-X
Toll-Like 4		3FXI	3,10 Å	Difração de Raio-X

As moléculas-base para desenho dos ligantes foram selecionadas por cada equipe a partir de levantamento bibliográfico. O Quadro 2 correlaciona os alvos e os protótipos investigados para obtenção dos derivados, além de demonstrar os ligantes selecionados para *docking*, após a modificação molecular.

Cada grupo defendeu um derivado específico, aquele que, de acordo

com suas análises apresentou resultados mais promissores em energia de ligação e interações intermoleculares, cujas, incluíram ligações de hidrogênio, *pi*-*alqui*, *pi*-*aniôn*, *pi*-*pi* e *alquil* e podem ser visualizadas na Figura 2. Os resultados obtidos após o *docking* estão dispostos na Tabela 2, expressos em energia de ligação (kcal mol⁻¹) indicando as melhores poses geradas e visualizadas no Discovery Studio.

Quadro 2. Moléculas base e derivados desenhados pelos estudantes a partir destas, para atuar nos respectivos alvos proteicos

Proteína	Molécula base	Derivado
Neuropilina-1	 Kaempferol	 KAED
Receptor canabioide tipo II	 Espilantol	 ESPD
3CLpro/Mpro	 Quercetina	 QUED
NSP 9	 1,4-naftoquinona	 NAFD
NF-kB quinase	 Curcumina	 CURD
TMPRSS2	 Geniposídeo	 GEND
Toll-Like 4	 Celastrol	 CELD

Os valores referentes à energia de ligação são inferiores em todos os derivados testados frente aos ligantes nativos o que indica uma maior afinidade de ligação e um potencial composto ativo a ser investigado. Destaque para as moléculas CURD, GEND e CELD com boa afinidade, em termos energias de ligação, ao respectivo alvo.

Visto que o sítio de ligação de um alvo molecular é constituído por aminoácidos que estão envolvidos tanto no reconhecimento molecular, ou seja, interação com a molécula bioativa, bem como no mecanismo de ação da macromolécula, as interações moleculares entre alvo e substrato são importantes não só pelo seu papel na promoção do efeito farmacológico, mas também na formação e estabilidade da estrutura protéica.¹²

Nesse contexto, todos os derivados apresentaram mais de uma ligação de hidrogênio, sendo o derivado GEND o que apresentou o maior número deste tipo de ligação. Esta é considerada um dos mais importantes tipos de interação em decorrência da sua especificidade, conferindo também estabilidade à interação.¹²

Ao comparar o desempenho do derivado KAED com o estudo realizado por Vique-Sánchez¹³ nota-se a interação por meio de ligação π -ânion com Asp320, um aminoácido importante na inibição de Neuropilina-1. Ademais, os resultados mostraram que a molécula QUED interagiu com Cys145 e His41 por meio de ligação de hidrogênio, sendo estes os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico de 3CLpro/Mpro.¹⁴ Ainda, o composto GEND ligou-se aos resíduos His296 e Ser441 por meio de interações π - π e de hidrogênio, respectivamente, sendo estes integrantes da tríade catalítica de TMPRSS2.¹⁵ Com o perfil de interações intermoleculares descritos, pode-se inferir que esses derivados possuem potencial para atuar inibindo as enzimas supracitadas, promovendo, por diferentes mecanismos, a diminuição da replicação viral.

Contudo, alguns protótipos planejados pelos estudantes não apresentaram resultados tão expressivos como os já mencionados. O ESPD, por exemplo, exibiu poucas interações em comum com um composto projetado por Li e colaboradores¹⁶ para inibição seletiva do receptor canabinoide tipo II. Portanto, nota-se que D02 não se encaixou inteiramente na região catalítica do receptor, sendo necessária a realização de ajustes na estrutura química do composto, de modo que este se torne mais específico ao alvo.

Os aminoácidos essenciais para inibição de Nsp9 ainda não foram identificados até o momento. Pesquisas recentes evidenciaram cavidades na superfície proteica que possivelmente sejam acessíveis aos fármacos, entretanto, dentre as interações intermoleculares citadas nos estudos, nenhuma foi semelhante às apresentadas pelo derivado NAFD com o alvo biológico em questão.^{17,18} Do mesmo modo, o

estudo de Cheemanapallie e colaboradores¹⁹ identificou Tyr357, Cys359, Glu360, Lys444, Lys445 e Lys541 como os resíduos que compõem o sítio ativo de NF- κ B, porém a molécula CURD não demonstrou interação com os aminoácidos citados.

Recentemente, Hansur e colaboradores²⁰ constataram que a dafnoretina, oriunda de *Carthamus tinctorius* (Cártamo), é um potencial inibidor do receptor *Toll-like 4*, sendo que este atua na superprodução de citocinas inflamatórias durante a infecção por SARS-CoV-2. Relacionando o padrão de *docking* da dafnoretina e do derivado CELD com o *Toll-Like 4*, observa-se que as moléculas não interagem com os mesmos aminoácidos, logo, o encaixe de CELD com o alvo ocorre distante da região catalítica.

Por fim, com o auxílio do software SwissADME, foi possível prever as propriedades físico-químicas dos derivados planejados como massa molecular, LogP, número de aceptores e doadores de hidrogênio. A comparação das estruturas químicas com os dados disponíveis em plataformas virtuais permite a previsão e seleção de moléculas com bom perfil farmacocinético, isto é, aquelas que, em teoria, apresentarão biodisponibilidade oral satisfatória.²¹ Os dados físico-químicos de cada derivado podem ser visualizados na Tabela 3.

Os resultados obtidos mostraram que, com exceção de CELD (massa molecular > 500 g mol⁻¹), todos os protótipos atenderam às especificações de Lipinski, evidenciando moléculas com atributos desejáveis no que diz respeito à absorção e permeabilidade em membranas biológicas, logo, estas predições apresentaram bons candidatos a fármacos contra o SARS-CoV-2. Ademais, compostos com boa biodisponibilidade possibilitam administração em menores quantidades e em maiores intervalos de tempo, o que pode gerar maior aceitação do tratamento pelo paciente.²²

Diante do exposto, é notável que o emprego de ferramentas computacionais no planejamento e desenvolvimentos de fármacos é vantajoso, visto que o processo tradicional para introdução de um novo fármaco no mercado é demorado e requer altos investimentos para garantia da eficácia e segurança do medicamento. Dessa forma, esta prática promove a redução de possíveis fracassos e prejuízos para a indústria, já que é possível avaliar a interação entre moléculas e receptores biológicos, predizendo o comportamento dos compostos em condições fisiológicas reais.^{23,24}

Nesse sentido, a técnica computacional empregada no presente estudo visa deduzir a interação entre uma macromolécula e um ligante, prevendo a provável orientação deste, a afinidade de ligação e as forças intermoleculares envolvidas no reconhecimento molecular. Assim, para facilitar a triagem biológica, os melhores candidatos, segundo o padrão de complementaridade com o alvo

Tabela 2. Resultados do *docking* molecular

Molécula base		Derivado			
Nome	Energia de Ligação (kcal mol ⁻¹)	Nome	Energia de Ligação (kcal mol ⁻¹)	Ligações de Hidrogênio	Outras Interações
Kaempferol	-6,9	KAMD	-7,1	Trp301; Tyr353	Asp320; Tyr297
Espilantol	-6,7	ESPD	-6,9	Phe87	Phe91, 94, 106, 183, 184, 281; Pro184; Ser90; Ile110; His 95
Quecértina	-7,0	QUED	-7,2	His41; Cys145; His163; Gln189	Ser46
1,4-naftoquinona	-7,8	NAFD	-8,1	Ser59; Val41	Arg39; Phe56; Ile65
Curcumina	-7,1	CURD	-8,3	Tyr98; Lys44; Cys99	Ile165; Val29; Leu21; Met96
Geniposídeo	-7,3	GEND	-9,0	Gln438; Asp435; Ser441; Gly464; Trp461; Ser436; Ser463	Thr459; Ser460; Gly472; Pro471; Val473; Gly462; Cys465; Ala466; Thr341; Leu419 e Tyr416
Celastrol	-8,0	CELD	-8,5	Arg264	Lys388; Lys362; Lys341

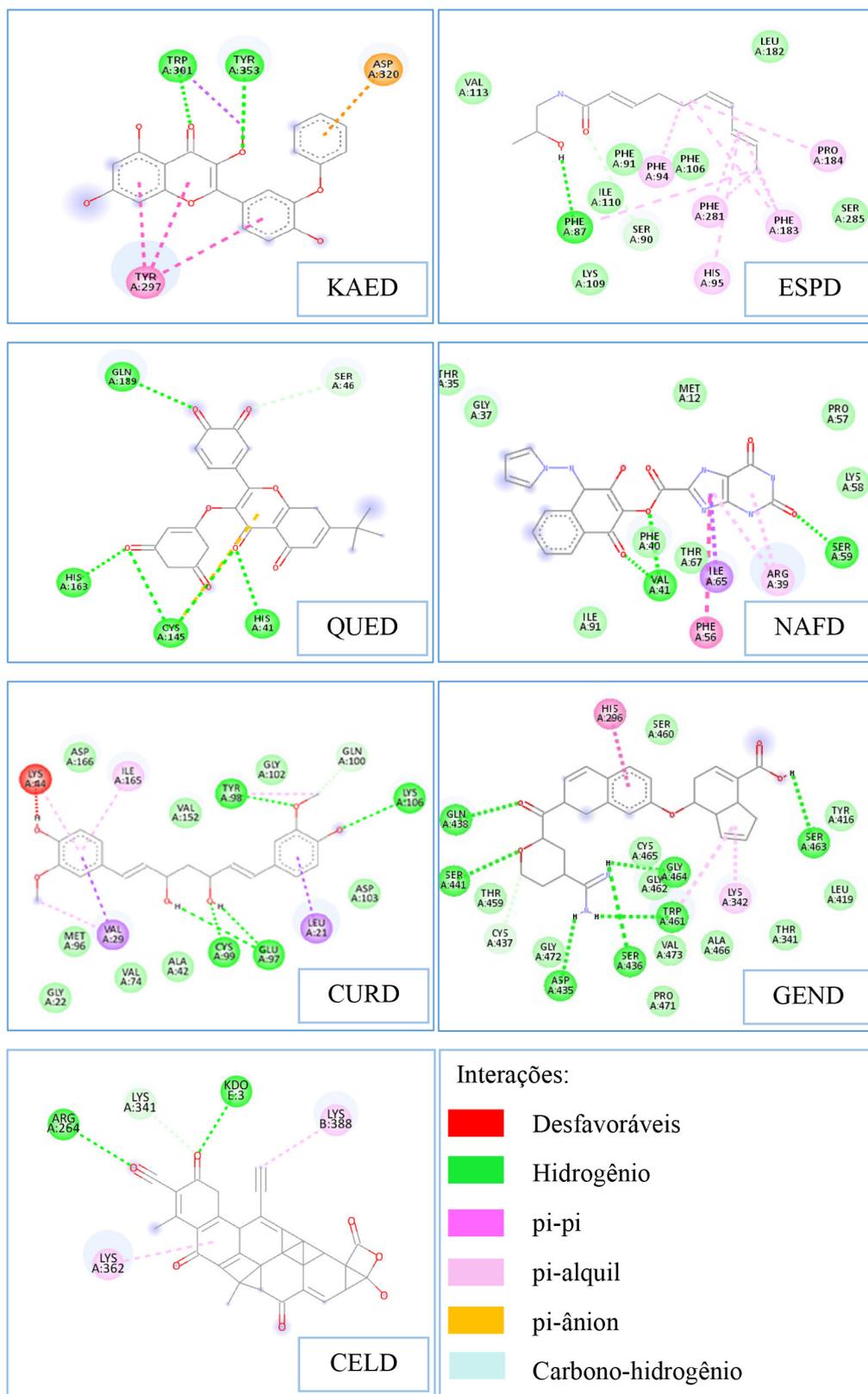


Figura 2. Interações intermoleculares entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo das proteínas e os derivados planejados

escolhido, são selecionados para os demais ensaios necessários. Logo, muitos compostos podem ser avaliados virtualmente frente a uma determinada enzima em um curto período e com menos gastos quando comparado com as técnicas experimentais.²⁵

Para que possa ser executada, a triagem virtual necessita condicionalmente de uma estrutura 3D da proteína alvo a qual pode

ser obtida de bancos de dados como o PDB. Muitos estudos vêm sendo publicados com uso de *docking* molecular, na descoberta de análogos de estruturas já conhecidas, a exemplo o captopril, um medicamento anti-hipertensivo de grande uso clínico. Os antivirais saquinavir, sitonavir, indinavir e zanamivir são exemplos de fármacos obtidos por modelagem molecular, além de outros como aliscireno

Tabela 3. Predição dos parâmetros físico-químicos dos derivados pelo software SwissADME

Derivado	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Aceptores H	Doadores H	LogP
KAED	392,36	7	3	3,23
ESPD	221,34	1	1	3,36
QUED	452,45	8	5	3,07
NAFD	368,26	8	4	2,85
CURD	294,30	4	2	2,59
GEND	462,54	6	3	2,84
CELD	510,62	7	5	2,79

(medicamento anti-hipertensivo), boceprevir (inibidor de protease usado para o tratamento da hepatite C), nolatrexed (em ensaio clínico de fase III para o tratamento do câncer de fígado).^{26,27}

Devido à urgência por um tratamento adequado ao combate do SARS-CoV-2, vários alvos terapêuticos foram cogitados e alguns estudos mostraram-se promissores. Análogos estruturais de lopinavir e favipiravir foram projetados por Rafi e colaboradores²⁸ na busca por inibidores de Mpro e RdRp, respectivamente. Cinco moléculas foram propostas e o resultado do *docking* molecular mostrou fortes interações com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico, assim como boas propriedades farmacocinéticas. Mais tarde, Singh e colaboradores²⁹ não só avaliaram virtualmente um composto frente a protease Mpro, mas também sintetizaram a molécula e demonstraram a sua atividade inibitória *in vitro*, confirmando os dados obtidos por meio do *docking* molecular e demais técnicas da bioinformática.

Uma vez que os métodos *in silico*, como o *docking* molecular, são comumente utilizados no planejamento e desenvolvimento de medicamentos, os estudantes do curso de Farmácia devem ter contato com recursos computacionais no decorrer da graduação para que haja formação de um profissional que esteja habilitado para atender às novas tendências do mercado, isto é, farmacêutico com perfil multidisciplinar capaz de analisar propriedades moleculares, preparar alvos e ligantes, além de interpretar os dados gerados pelos diversos softwares disponíveis.^{30,31}

Ainda, a utilização de ferramentas computacionais em aulas práticas pode ser de extrema relevância no processo educacional. Porém, vale ressaltar que o software por si só não possui a capacidade de estimular a aprendizagem, sendo necessário que a integração desses recursos na prática pedagógica esteja associada a estratégias que visem facilitar e potencializar a construção do conhecimento.²⁴ Como esses programas são capazes de simular situações que dificilmente poderiam ser reproduzidas no ambiente real, a compreensão dos conceitos teóricos mais complexos ministrados em sala de aula pode ser adquirida de forma mais lúdica pelos imagens geradas pelos softwares.^{32,33}

Ademais, na perspectiva de metodologias ativas, torna-se fundamental que os alunos tenham a oportunidade de debater suas ideias, inclusive diante de pesquisadores da área, e não meramente apresentá-las ou entregá-las na forma de trabalho. Nesta experiência, os estudantes puderam discutir com um farmacologista e um químico medicinal vários aspectos de suas ideias, podendo, portanto, aprimorá-las e sanar algumas dúvidas. Não obstante, os melhores projetos foram selecionados pela equipe da disciplina e avaliadores para receberem suporte para publicação, trazendo mais esse benefício acadêmico para os estudantes.

CONCLUSÃO

Nota-se que o *docking* molecular é uma ferramenta útil não só

nas etapas que compõem o planejamento e desenvolvimento de um fármaco, mas também no processo educacional, auxiliando na fixação dos conhecimentos transmitidos em sala de aula por simular situações que por vezes são de difícil compreensão pelo aluno. Dessa maneira, formam-se profissionais farmacêuticos multifacetados e aptos para realizarem as atividades exigidas no mercado de trabalho. Tendo como plano de fundo o avanço desenfreado da pandemia de COVID-19 nos últimos anos, a triagem computacional de moléculas bioativas contra o vírus é de extrema relevância.

De acordo com os resultados obtidos nesta experiência, pode-se inferir que os derivados KAED, QUED e GEND possuem boa afinidade com Neuropilina-1, TMPRSS2 e 3CLpro/Mpro, respectivamente, mostrando fortes interações com sítio ativo, o que permite a inibição da enzima, e consequentemente, impede a replicação viral durante a infecção por SARS-CoV-2. As demais moléculas propostas podem ser utilizadas em estudos posteriores visando melhoria da afinidade com as respectivas macromoléculas, visto que apresentaram perfil farmacocinético adequado.

Dessa forma, os estudantes foram desafiados a usar os conhecimentos aprendidos em sala de aula para tentar solucionar um problema real da sociedade em que estão inseridos, dentro da perspectiva de sua futura profissão. Neste caso em específico, ainda conseguiu-se relacionar a importância do desenvolvimento de fármacos com a necessidade de agregar valor à flora brasileira, especialmente a amazônica, para que o Brasil não seja tão dependente de tecnologia estrangeira no seu sistema de saúde. Em suma, foi uma experiência agregadora em vários sentidos, que mostrou como a Química Medicinal é ciência complexa e multifacetada, sendo uma das disciplinas mais importantes do curso de Farmácia.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O tutorial para a realização do *docking* molecular, segundo a metodologia adotada neste trabalho, está disponível em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo pdf, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em especial à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, campus Manaus, por todo suporte. Agradecem também aos Professores Carlos Klinger Rodrigues Serrão (Universidade Nilton Lins) e François Germain Noël (Universidade Federal do Rio de Janeiro) por sua participação como avaliadores dos projetos apresentados pelos estudantes. Este trabalho foi desenvolvido durante o estágio de docência da primeira autora, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFAM, sob a orientação da Profa. Dra. Fernanda Guilhon-Simplicio.

REFERÊNCIAS

- Pawar, G.; Madden, J. C.; Ebbrell, D.; Firman, J. W.; Cronin, M. T. D.; *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 561. [Crossref]
- Lu, H.; Stratton, C. W.; Tang, Y. W.; *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 401. [Crossref]
- Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W.; *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727. [Crossref]
- Santos, L. H. S.; Ferreira, R. S.; Caffarena, E. R.; *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2053*, 13. [Crossref]
- Smith, S. T.; Meiler, J.; *PLoS One* **2020**, *15*, e0240450. [Crossref]
- Cavasotto, C. N.; Aucar, M. G.; Adler, N. S.; *Int. J. Quantum Chem.* **2019**, *119*, e25678. [Crossref]

7. Poustforoosh, A.; Faramarz, S.; Nematollahi, M. H.; Hashemipou, H.; Tuzun, B.; Pardakhty, A.; Mehrabani, M.; *J. Cell. Biochem.* **2022**, *123*, 390. [Crossref]
8. Torres, P. H. M.; Sodero, A. C. R.; Jofily, P.; Silva Júnior, F. P.; *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4574. [Crossref]
9. Alvarez, A. C.; Costa, A. M.; Vilarassa, J.; *Molecules* **2017**, *22*, 136. [Crossref]
10. Lipinski, C. A.; *Drug Discovery Today: Technol.* **2004**, *1*, 337. [Crossref]
11. Branco, C. H. L. G. T.; Simplicio, F. G.; Mesquita, L. S. B.; *Mecanismos Gerais em Química Orgânica: Guia Prático para Estudantes de Farmácia*, 1ª ed.; BK Editora: Manaus, 2020.
12. Fokoue, H. H.; Pinheiro, P. S. M.; Fraga, C. A. M.; Sant'Anna, C. M. R.; *Quim. Nova* **2020**, *43*, 78. [Crossref]
13. Vique-Sánchez, J. L.; *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *33*, 116040. [Crossref]
14. Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R.; *Science* **2020**, *368*, 409. [Crossref]
15. Roomi, M. S.; Khan, Y. D.; *ChemRxiv* **2020**, *v1*, 1. [Crossref]
16. Li, X.; Hua, T.; Vemuri, K.; Ho, J. H.; Wu, Y.; Wu, L.; Popov, P.; Benchama, O.; Zvonok, N.; Locke, K.; Qu, L.; Han, G. W.; Iyer, M. R.; Cinar, R.; Coffey, N. J.; Wang, J.; Wu, M.; Katritch, V.; Zhao, S.; Kunos, G.; Bohn, L. M.; Makriyannis, A.; Stevens, R. C.; Liu, Z. J.; *Cell* **2019**, *176*, 459. [Crossref]
17. Littler, D. R.; Gully, B. S.; Colson, R. N.; John, J. R.; *iScience* **2020**, *23*, 101258. [Crossref]
18. Araújo, J. O.; Pinheiro, S.; Zamora, W. J.; Alves, C. N.; Lameira, J.; Lima, A. H.; *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 23003. [Crossref]
19. Cheemanapalli, S.; Chinthakunta, N.; Shaikh, N. M.; Shivaranjani, V.; Pamuru, R. R.; Chitta, S. K.; *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics* **2019**, *8*, 15. [Crossref]
20. Hansur, L.; Louisa, M.; Wuyung, P. E.; Fadilah, F.; *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* **2022**, *10*, 220. [Crossref]
21. Piccirillo, E.; do Amaral, A. T.; *Quim. Nova* **2018**, *41*, 662. [Crossref]
22. Pereira, D. G.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1. [Crossref]
23. Lin, X.; Li, X.; Lin, X.; *Molecules* **2020**, *25*, 1375. [Crossref]
24. Silva, R. S.; *Revista Amor Mundi* **2020**, *1*, 43. [Crossref]
25. Santos, L. H.; *Revista Brasileira de Bioinformática* **2021**, *1*, 1. [Crossref]
26. Chaput, L.; Mouawad, L.; *J. Cheminf.* **2017**, *9*, 37. [Crossref]
27. Devi, R. V.; Sathya, S. S.; Coumar, M. S.; *Applied Soft Computing* **2015**, *27*, 543. [Crossref]
28. Rafi, O.; Bhattacharje, G.; Al-Khafaji, K.; Taskin-Tok, T.; Alfasane, A.; Das, A. K.; Parvez, A. K.; Rahman, S.; *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2020**, *40*, 3711. [Crossref]
29. Singh, G.; Pawan; Mohit; Diksha; Suman; Priyanka; Sushma; Saini, A.; Kaur, A.; *J. Mol. Struct.* **2022**, *1250*, 131858. [Crossref]
30. Nunes, R. R.; da Fonseca, A. L.; Pinto, A. C. S.; Maia, E. H. B.; da Silva, A. M.; Varotti, F. P.; Taranto, A. G.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2019**, *114*, e180465. [Crossref]
31. Rodrigues, G. S.; Avelino, J. A.; Siqueira, A. L. N.; Ramos, L. F. P.; Santos, G. B.; *Quim. Nova* **2021**, *44*, 1036. [Crossref]
32. Maia, E. H. B.; Assis, L. C.; de Oliveira, T. A.; da Silva, A. M.; Taranto, A. G.; *Front. Chem. (Lausanne, Switz.)* **2020**, *8*, 343. [Crossref]
33. Mesquita, J. M.; Mesquita, L. S. F.; Barroso, M. C. S.; *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e458101115278. [Crossref]