

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

VITÓRIA JULIANE DE AQUINO SIVIERI

**TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS INIBIDORES PARA A
PROTEÍNA NS 5 DE DENGUE VIRUS SOROTIPO 3**

Uberlândia - MG
2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

VITÓRIA JULIANE DE AQUINO SIVIERI

**TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS INIBIDORES PARA A
PROTEÍNA NS 5 DE DENGUE VIRUS SOROTIPO 3**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito de aprovação no curso de Biotecnologia – Bacharelado da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Nilson Nicolau Junior

Uberlândia - MG
2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

VITÓRIA JULIANE DE AQUINO SIVIERI

**TRIAGEM VIRTUAL DE POTENCIAIS INIBIDORES PARA A
PROTEÍNA NS 5 DE DENGUE VIRUS SOROTIPO 3**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito de aprovação no curso de
Biotecnologia – Bacharelado da Universidade
Federal de Uberlândia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Nilson Nicolau Junior
Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Prof. Renata Santos Rodrigues
Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Prof. Diego Pandeló José
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Dedico esse trabalho a Deus, o detentor de todo Conhecimento e Sabedoria que me concedeu o privilégio de ser cientista.
“... Não tem sabedoria aquele que dá ao homem o conhecimento.?”

Salmos 94; 10b

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus porque ele foi o meu sustento e meu mestre.

Agradeço aos meus pais que estiveram sempre do meu lado.

*Agradeço ao Professor Nilson Nicolau Junior que me acolheu
e me orientou nesse projeto quando eu mais precisei.*

*Agradeço ao Psicólogo Silas Fernandes que me ajudou a
superar meus desafios.*

*Agradeço a todos os meus amigos que não me abandonaram
e foram como irmãos para mim.*

RESUMO

A dengue é uma doença que se tornou uma grande preocupação para a saúde pública e, de acordo com a OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde), nas últimas décadas, a incidência global da enfermidade aumentou drasticamente. Ela é causada por um agente etiológico pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* e tem como vetor de transmissão, o mosquito *Aedes aegypti*.

Apesar do indivíduo diagnosticado com a doença ser tratado com medicamentos que melhorem os sintomas, não existe nenhum registro científico de antivirais que sejam eficazes contra o vírus da dengue. Por essas razões, se faz necessária a busca e descoberta de possíveis fármacos que tratem diretamente o agente causador dessa enfermidade e um dos alvos que mostra bastante potencial para esses estudos é uma proteína não estrutural do Dengue vírus conhecida como NS5 que, durante o ciclo de replicação em células humanas, tem como papel, ser uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) que replica o genoma viral e ajuda o vírus a escapar do sistema imunológico.

Atualmente, a bioinformática se tornou uma área de conhecimento muito importante nessa corrida, pois ela oferece várias ferramentas que ajudam o pesquisador a estudar previamente compostos que possam ser potenciais medicamentos como, por exemplo, a triagem virtual que filtra um banco de dados com inúmeras moléculas e retira aquelas que não cumprem requisitos básicos para serem futuramente utilizadas.

Outro procedimento é conhecido como ancoragem que testa o encaixe desses compostos na proteína alvo e há o teste de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) utilizado para comprovar as várias características das moléculas.

Utilizando as ferramentas disponíveis da bioinformática foi possível obter a proteína NS5 do Dengue vírus juntamente com seu ligante e construir um modelo baseando-se em sua forma para fazer os processos de triagem virtual, ancoragem molecular e teste de toxicidade encontrando, como resultado, dois compostos, a Fasciculiferina e a 3,3-O-Dimetilquercetina, que tiveram desempenhos interessantes para esse trabalho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS:

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção E Toxicidade.

PDB - Protein Data Bank.

vROCS - Programa baseado no método de comparação de forma.

NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais.

RdRp - *RNA-dependent RNA polymerase*.

CADD - *Computer-Aided Drug Design*

DENV - Vírus da dengue

pkCSM – programa que avalia o ADMET de uma molécula.

SUMÁRIO:

INTRODUÇÃO	09
OBJETIVOS	13
MATERIAIS E MÉTODOS	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXOS	32

1. INTRODUÇÃO

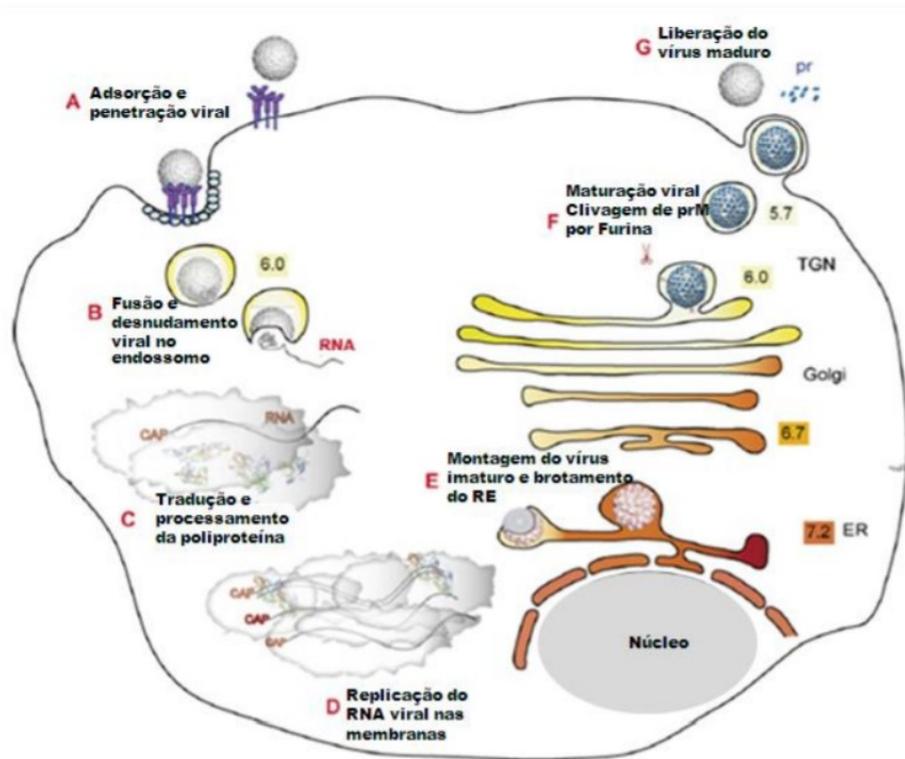
A dengue é uma doença causada por um vírus conhecido como Dengue vírus (DENV) da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* que é caracterizado por ser envelopado, conter o RNA como material genético e suas partículas esféricas chegam a medir de 40 a 50 nm em diâmetro (NAGATA, 2009). Essa enfermidade assola grande parte das pessoas, pois, dois quintos da população mundial vivem em áreas endêmicas e correm grandes riscos de contraí-la (GUO et al., 2017; MENDONÇA et al., 2018). Atualmente sabe-se que existem quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, que circulam simultaneamente e causam sintomas como: febre baixa ou alta e incapacitante; dor de cabeça; dor atrás dos olhos; dores musculares; dores nas articulações e erupções cutâneas. Além disso, a saúde do indivíduo pode se agravar e esses sintomas podem evoluir para casos de febre hemorrágica e até síndrome de choque letal (CANNALIRE et al., 2018).

A replicação viral já é conhecida dentro de células humanas e começa pela endocitose que só é realizada quando ocorre a interação de proteínas do envelope (Proteína E) com receptores celulares. Depois de ser internalizada, a partícula é exposta a um pH baixo no compartimento pré-lisossomal endocítico induzindo a fusão do envoltório do vírus e a membrana celular permitindo o processo de desnudamento e liberação do material genético viral no citoplasma. (NAGATA, 2009; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008)

A partir desse momento, ocorre o processo de tradução gerando uma poliproteína que será clivada por proteases codificadas pela célula hospedeira e a protease do próprio vírus (NS2b/NS3) resultando, ao final da etapa, dez proteínas: três sendo estruturais (C, prM e E) e sete sendo não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). Após a síntese da NS5, se inicia a replicação de RNA que servirá de molde para futuras fitas de material genético, possibilitando a montagem de partículas virais no retículo endoplasmático.

No complexo de Golgi, devido ao pH ácido, o vírus ainda imaturo sofrerá um rearranjo nas proteínas do envelope e uma clivagem proteolítica da proteína prM em “pr” e “M” pela protease furina celular caracterizando na sua maturação e liberação da célula por exocitose. (LIM, 2015; MARINHO, 2015; NAGATA, 2009; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

FIGURA 1 - Ciclo de replicação de um flavivírus em células humanas



Fonte: (MARINHO, 2015; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008)

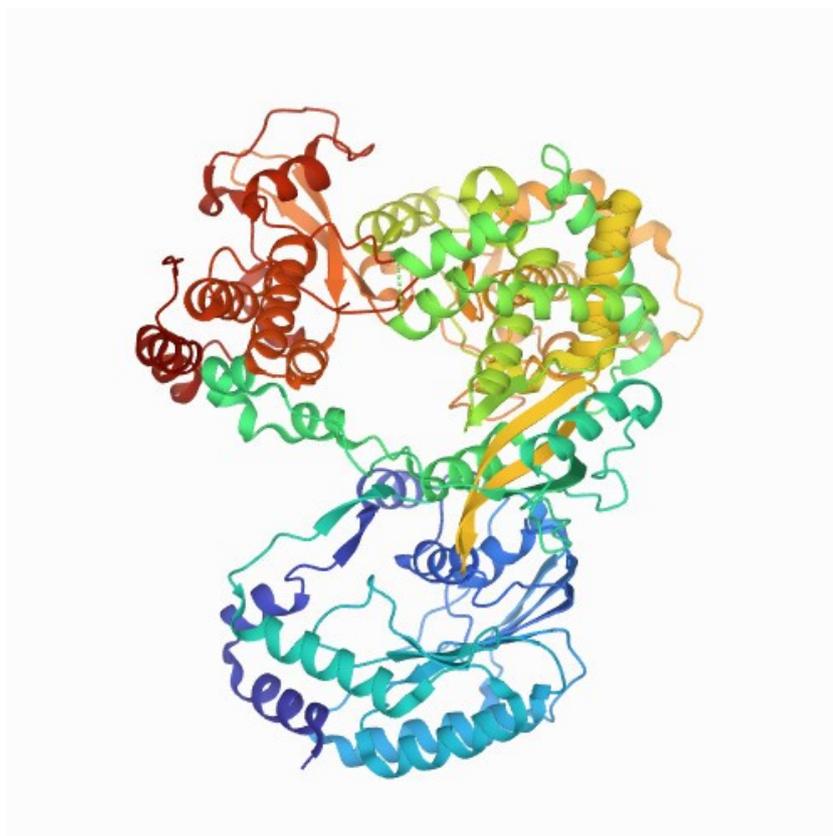
No Brasil, a primeira epidemia de dengue confirmada de modo clínico foi em Boa Vista (Roraima) no ano de 1981 e, desde então, se tornou comum a circulação do vírus: após um período de 2 a 4 anos há o declínio do sorotipo prevalente durante esse intervalo ocorrendo a substituição de um novo sorotipo trazendo um grande desafio para manter sob controle a disseminação da enfermidade na população (BEZERRA et al., 2021; MARINHO, 2015). Os métodos de prevenção para barrar a propagação do DENV baseiam-se em combater o vetor de transmissão conhecido por ser o mosquito *Aedes aegypti* que é originário da África subsaariana e seu processo adaptativo vem permitindo a rápida difusão espacial e o seu explosivo crescimento nas áreas urbanas. (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; FERREIRA; CHIARAVALLI NETO; MONDINI, 2018; KRAEMER et al., 2019)

Por isso, há grande preocupação da sociedade para evitar a propagação e a reprodução do agente transmissor. Apesar de existir vacina para a dengue, a taxa de proteção adquirida por ela ainda está em estudo e não há antivirais para o tratamento da doença (CANNALIRE et

al., 2018). É por esse motivo que existe a necessidade da pesquisa para descobrir um possível fármaco que, futuramente, possa ser utilizado.

Atualmente, o alvo desses estudos é uma das proteínas não estruturais: a NS5. Ela é interessante para o desenvolvimento de futuros medicamentos, pois tem um alto nível de conservação em sua estrutura entre os sorotipos do vírus da dengue (mantendo, aproximadamente, 70% de identidade de sua sequência) e também entre os outros flavivírus, o que possibilita projetar compostos de amplo espectro. Possui aproximadamente 900 kDa e exerce um papel importante, pois ela tem como funcionalidade, a replicação do material genético do vírus e também auxilia em sua proteção por apresentar dois domínios: domínio N-terminal que codifica atividades enzimáticas envolvidas para a formação do RNA cap e domínio C-terminal que tem a função de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) estritamente necessária para a formação de partículas virais em células hospedeiras (LIM, 2015; NAGATA, 2009).

FIGURA 2 – Estrutura da proteína NS5 do dengue vírus sorotipo 3



Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/5JJR>

Hoje, a pesquisa para novos medicamentos é bastante complexa e necessita da interação de áreas como inovação, conhecimento e tecnologia (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008). É nesse contexto que o *Computer-Aided Drug Design* (CADD) se tornou uma ferramenta de grande importância que ajuda o mundo científico, agilizando e tornando os estudos mais baratos. É uma técnica que visa calcular, por exemplo, a similaridade de ligantes *in silico*.

O CADD tem duas maneiras de ser utilizado: baseando-se na estrutura ou baseando-se no ligante. O primeiro método utiliza o conhecimento e a disponibilização prévia da disposição da proteína alvo para o desenho de compostos que possam se ligar a ela. Já o segundo processo usa apenas as informações obtidas pelos ligantes para prever sua atividade e similaridade química (SLIWOSKI et al., 2014).

A triagem virtual é outro procedimento muito importante utilizado para o desenho de fármacos que, basicamente, consiste em testar, *in silico*, um número de compostos contra um alvo, procurando algum tipo de resposta. Ela tem o seu diferencial por não incluir no processo, substâncias preditas como inativas e assim, facilitando, reduzindo o número de falhas, tornando mais barato e mais rápido os futuros testes *in vitro* (SOUSA et al., 2020).

A ancoragem molecular é utilizada para prever um melhor encaixe de um ligante a uma molécula, permitindo várias conformações e orientações possíveis dele no local de ligação da proteína. Ao final do processo, o pesquisador terá uma lista ranqueada das melhores interações calculada pelo software (SALMASO; MORO, 2018).

Ao usar essas ferramentas disponíveis, é possível direcionar as buscas a uma solução direta para vários tipos de males e doenças que assolam a população, incluindo a dengue que gera, há muito tempo, grande preocupação na sociedade e na nação brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Construir um modelo para a busca de possíveis fármacos para o Dengue vírus sorotipo 3 através da triagem virtual.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um modelo baseado em forma de um inibidor conhecido da NS5 extraído do banco de dados do PDB.
- Realizar a técnica de triagem virtual no banco de dados de produtos naturais do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).
- Fazer a ancoragem molecular nos programas FRED e GOLD a partir dos resultados da triagem.
- Analisar os dados de toxicidade pelo pkCSM das moléculas selecionadas.
- Gerar diagrama 2D dos complexos selecionados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Geração de modelo

A proteína NS5 do Dengue vírus sorotipo 3 foi escolhida por causa dos dados obtidos e do método utilizado durante os estudos de Lim et al., (2016) que, através de uma triagem baseada em fragmentos usando cristalografia de raios-X, ele conseguiu identificar um composto que, mais tarde, serviria como modelo para outras estruturas modificadas e sintetizadas que se ligariam à proteína. Uma dessas modificações foi o composto 29 (ID: 68E) que foi escolhido por se ligar a porção C-terminal no sítio RdRp e reter uma atividade inibidora não competitiva potente. Depois, foi utilizado o programa vROCS 3.2.0.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007) para gerar um modelo baseado na forma do ligante escolhido para o seguimento das próximas etapas do estudo.

3.2. Triagem virtual

Após a geração do modelo baseado na forma, foram feitas as preparações para a etapa de triagem virtual. O banco de dados utilizado para esse estudo foi o NuBBE que contém, aproximadamente, 2223 moléculas provenientes de produtos naturais brasileiros que, logo em seguida, passou por uma etapa de filtragem feita pelo programa FILTER do OMEGA 3.1.2.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. (HAWKINS et al., 2010) para a retirada de compostos indesejáveis como aqueles que possuem alta massa molecular e/ou que são promíscuos, por exemplo.

Na etapa seguinte, as moléculas que passaram pela filtragem foram submetidas ao programa QUACPAC 1.6.3.1, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (<http://www.eyesopen.com>) que fornece os estados de protonação adequados para o pH7,4 do sangue e os isômeros conhecidos como tautômeros para cada composto do banco estudado. Posteriormente, foram geradas as várias conformações bioativas de cada composto do banco de dados através do OMEGA 3.1.2.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com> (HAWKINS et al., 2010).

Com as etapas de preparação feitas, a triagem virtual foi realizada utilizando o programa ROCS 3.3.2.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. (HAWKINS;

SKILLMAN; NICHOLLS, 2007) que, basicamente, é uma ferramenta de virtual screening que identifica compostos potencialmente ativos de maneira rápida através da comparação de forma.

3.3. Ancoragem molecular

Após o processo de virtual screening, foi obtida uma lista ranqueada dos 500 melhores compostos, com isso, partiu-se para a etapa de ancoragem molecular que, para realizá-la utilizou-se dois programas. O primeiro foi o GOLD (JONES et al., 1997) que usa um algoritmo para fazer o *docking* e o segundo programa foi o FRED do pacote OEDOCKING 3.4.0.2: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. (MCGANN, 2011) que faz esse processo por métodos não estocásticos examinando todas as possíveis poses do ligante na proteína. Para o seguinte passo, as dez melhores scores ChemPLP do GOLD e os sete melhores scores Chemgauss do FRED foram escolhidos para realizar as análises de toxicidade do ADMET.

3.4. Dados de toxicidade

Os compostos que tiveram melhores resultados no processo de ancoragem passaram pelo procedimento de análise de ADMET *in silico* onde foi utilizado o *software online* chamado pkCSM (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015) que mostra as características de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade de uma molécula. Os parâmetros abordados nesse estudo foram, apenas, de toxicidade onde foram discutidos:

LD 50 (em ratos): É conceituado como dosagem letal que, quando administrada uma única vez, tem a capacidade de matar 50% da população de ratos. Tem como objetivo avaliar a potência tóxica das moléculas.

Toxicidade para *Tetrahymena pyriformis*: A *T. pyriformis* é uma bactéria usada para determinar a toxicidade de uma substância. Pelos cálculos previamente feitos pelo programa, a dosagem é considerada tóxica quando o valor de resultado desse parâmetro é maior que -0,5 log ug/L que impedirá o crescimento de 50% do microorganismo.

Teste de AMES: É um teste onde se verifica o potencial mutagênico de uma molécula utilizando bactérias. Se o resultado der valores positivos, o composto é mutagênico e pode ser cancerígeno.

CL 50 (em peixes): Conceitua-se CL 50 como a concentração letal de uma substância que pode levar a morte, 50% da população de peixes conhecidos como *Flathead Minnows*. O resultado desse parâmetro que der abaixo de 0,5 mM indica que a molécula analisada tem alta toxicidade aguda.

Dose tolerada máxima: Esse teste estima a quantidade máxima tolerada da substância, baseando-se em testes de medicamentos feitos anteriormente em animais durante a fase I. Se o resultado for menor ou igual a 0,477 log (mg/kg/dia) é considerada baixa e será considerada alta se for maior que 0,477 log (mg/kg/dia).

Hepatotoxicidade: Essa análise tenta prever se um dado composto será hepatotóxico com base em vários efeitos colaterais observados em humanos causados por substâncias.

Toxicidade crônica em ratos por via oral: Esse parâmetro visa identificar a dose mais baixa da molécula estudada que poderá causar algum efeito adverso que pode ser observado.

Sensibilização da pele: Esse teste prevê se um composto pode causar algum tipo de sensibilização da pele, como por exemplo, a dermatite alérgica.

Inibidores de hERG I e II: Essa análise visa prever se a substância estudada pode inibir os canais de potássio codificados pelo hERG o que pode resultar em uma arritmia ventricular fatal. Essa foi uma das causas mais importantes de retiradas de medicamentos no mercado farmacêutico.

Além da toxicidade dos compostos, há também o teste da regra dos 5 de Lipinski onde se espera uma boa absorção se os critérios como: a molécula deverá ter, no máximo, 5 doadores de hidrogênio; não deverá ter mais do que 10 átomos de hidrogênio e oxigênio; A massa molecular não deverá ultrapassar 500 Da; uma partição octanol-água não poderá ser maior do que 5 e entre outros critérios forem respeitados (LIPINSKI et al., 1997).

3.5. Diagrama 2D

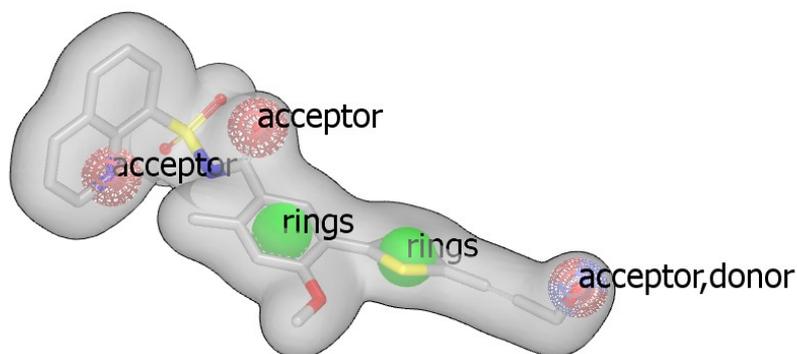
Após o processo de análises de ADMET, as moléculas que demonstraram melhores parâmetros tiveram seus diagramas 2D feitos e interações moleculares demonstradas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1. Geração de modelo

O pesquisador Lim et al., (2016) produziu, a partir de um composto encontrado no processo de triagem baseado em fragmentos usando cristalografia de raios-X, moléculas modificadas com diversos fins. O composto 29 (uma dessas modificações) serviu de base para a construção do modelo baseado em forma utilizado na triagem virtual. (Figura 3).

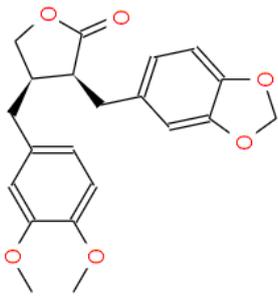
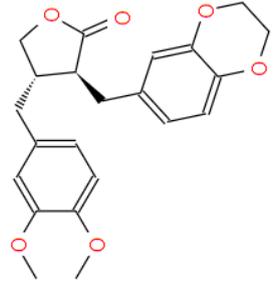
Figura 3 - O modelo gerado tem a forma parecida com a do ligante 29, destacada pela região cinza. Os pontos farmacofóricos definidos foram: 3 aceptores de hidrogênio representados por esferas vermelhas; a esfera azul sobreposta a esfera vermelha indica um doador de hidrogênio e os anéis aromáticos foram destacados pelas esferas verdes.

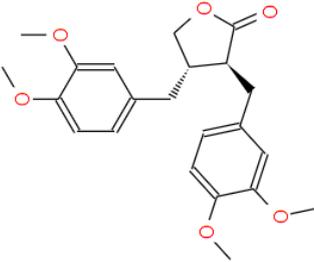
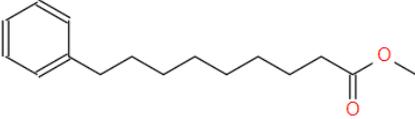
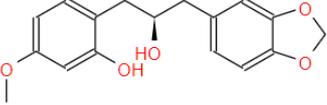
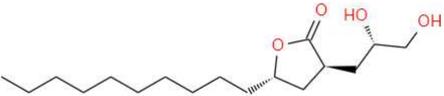


Fonte: imagem obtida pelo programa vROCS 3.2.0.4, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007)

4.2. Triagem virtual e ancoragem molecular:

O banco de dados de produtos naturais do NuBBE foi devidamente tratado, separando-se as moléculas com características de fármacos, sendo gerados posteriormente seus tautômeros e confórmeros bioativos para a triagem. A triagem virtual do banco de dados realizada com base no modelo baseado em forma obteve como resultado os 500 melhores compostos de acordo com o score TanimotoCombo. A ancoragem molecular foi realizada com as 500 melhores moléculas contra a NS5 utilizando dois programas: o GOLD e o FRED. Cada uma dessas duas ferramentas também possui seus próprios scores para separar os melhores compostos, sendo eles o ChemPLP (GOLD) e Chemgauss4 (FRED). Os resultados poderão ser observados na tabela 1 e 2.

Identificação:	Estrutura 2D:	TanimotoCombo:	ChemPLP:
NuBBE_2369		0.866	65.63
NuBBE_2370		0.847	61.47

NuBBE_2371		0.846	62.70
NuBBE_1152		0.821	61.00
NuBBE_1556		0.819	63.23
NuBBE_1793		0.818	60.59

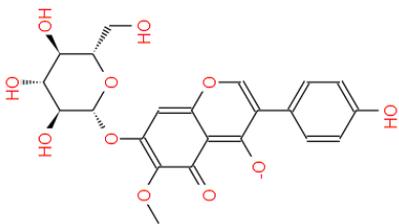
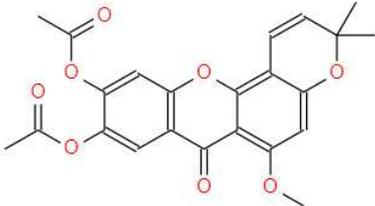
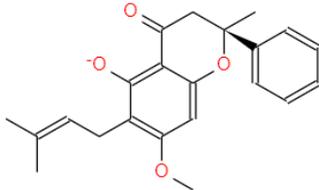
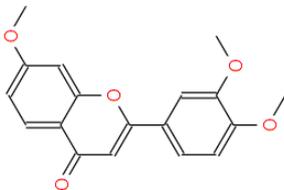
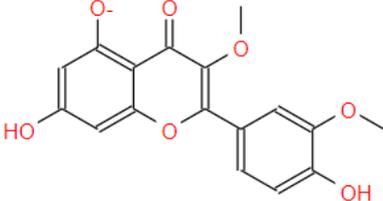
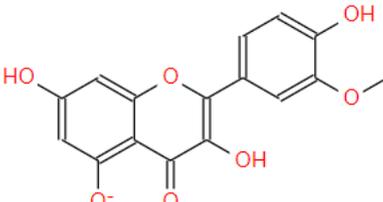
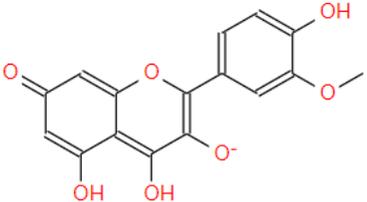
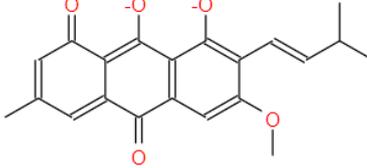
NuBBE_1664		0.813	63.80
NuBBE_1723		0.802	61.65
NuBBE_1825		0.800	61.13
NuBBE_178		0.793	60.59

Tabela 1: Moléculas com melhores escores da etapa de ancoragem - GOLD.

Identificação:	Estrutura 2D:	TanimotoCombo;	Chemgauss4:
NuBBE_1224		0.738	-10.146455
NuBBE_1787		0.737	-10.307801
NuBBE_1787		0.736	-10.899460
NuBBE_2088		0.733	-10.224477

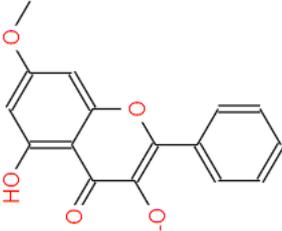
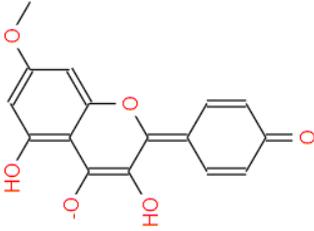
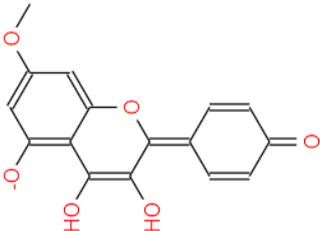
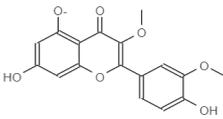
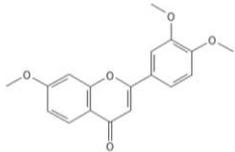
NuBBE_2430		0.715	-10.512042
NuBBE_2275		0.713	-10.998854
NuBBE_2275		0.708	-10.224970

Tabela 2: Moléculas com melhores escores da etapa de ancoragem - FRED.

4.3. Dados de toxicidade:

Os compostos listados e mostrados anteriormente passaram por um processo de análise de toxicidade e, depois de revisados todos esses parâmetros, foram selecionados os dois compostos, um de cada estratégia de ancoragem, com melhores resultados. Além disso, notou-se que ambas as moléculas cumpriam as regras de Lipinski que ditam aspectos específicos para compostos com características de fármacos. Os dois compostos apresentaram valores maiores do que o esperado para toxicidade para *T. pyriformis*, além desse dado, a molécula NuBBE – 178 mostrou ter um CL 50 menor do que o recomendado.

	 <p>NuBBE_1224</p> <p>Nome: 3,3- O - Dimetilquecertina</p> <p>(FRED)</p>	 <p>NuBBE_178</p> <p>Nome: Fasciculiferina</p> <p>(GOLD)</p>
Massa molecular	315,257	312,321
Logp	1,659	3,4858
Ligações rotacionáveis	2	4
Aceptores	7	5
Doadores	3	0
Teste de AMES	Não	Não
Dose tolerada máxima	0,401	0,493
Inibidores de hERG I	Não	Não
Inibidores de hERG II	Não	Não
LD 50	2,256	2,272
Toxicidade crônica em ratos por via oral	1,599	1,06

Hepatotoxicidade	Não	Não
Sensibilização da pele	Não	Não
Toxicidade para <u>T.</u> <u>pyriformis</u>	0,328	0,447
CL 50	2,497	0,14

Tabela 3: Os compostos que obtiveram os resultados mais adequados nos testes de toxicidade.

4.4. Diagramas 2D de interação ligante-proteína

Por fim, as moléculas escolhidas tiveram seus diagramas 2D gerados e suas interações moleculares representadas e analisadas logo a seguir:

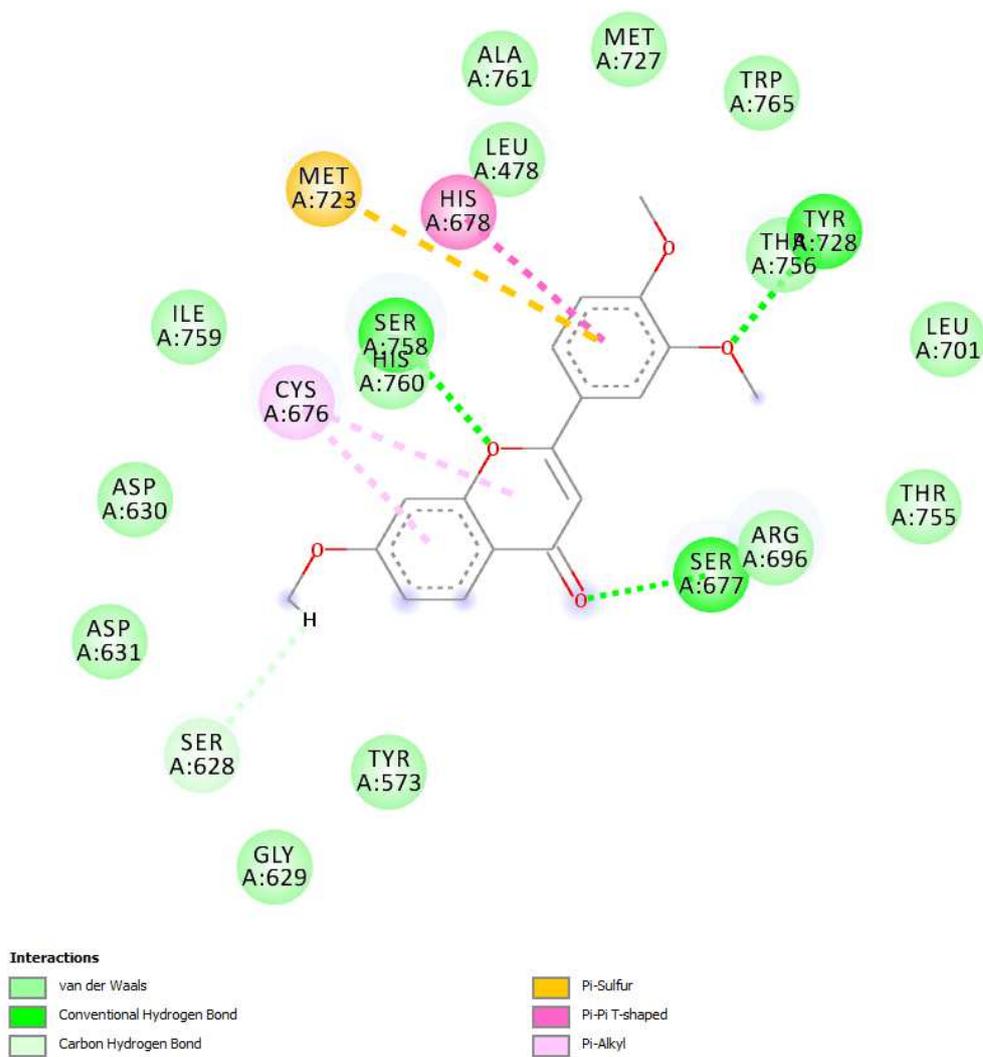


Figura 2: diagrama e interações moleculares do composto resultado do GOLD (NuBBE - 178).

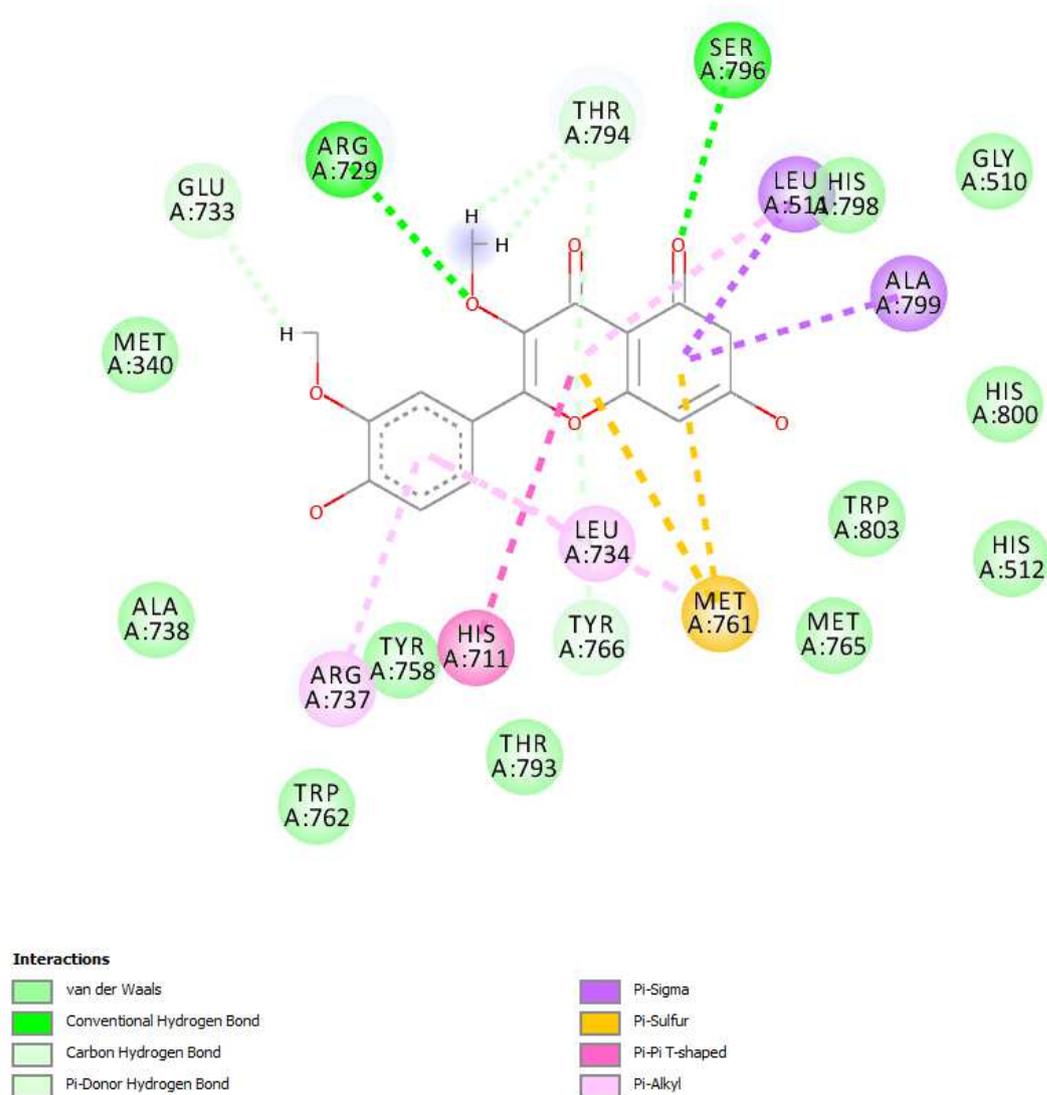


Figura 3: diagrama e interações moleculares do composto resultado do FRED (NuBBE - 1224).

Ao comparar as interações intermoleculares dos dois compostos, é possível perceber que em ambos apresentam ligações de Van der Waals nos aminoácidos HIS A:760, LEU A:478, ALA A:761, MET A:727, TRP A:765, THR A:756, LEU A:701, THR A:755, ARG A:696, TYR A:573, GLY A:629, ASP A:631, ASP A:630 e ILE A:759 da molécula resultado do GOLD cujo o código de identificação no banco de dados é NuBBE – 178 e; nos aminoácidos HIS A:798, GLY A:510, HIS A:800, TRP A:803, HIS A:512, MET A:765, THR

A:793, TYR A:758, TRP A:762, ALA A:738 e MET A:340 do composto resultado do FRED que possui o código de identificação NuBBE - 1224.

Apesar de terem ligações fracas, há outras interações que esses dois compostos apresentam que são resultados da existência de anéis dentro de sua estrutura. Na molécula representada pela figura 2, percebe-se uma ligação π -S no aminoácido MET A:761; uma ligação π - π em forma de T no aminoácido HIS A: 678 e duas ligações π -alquila no aminoácido CYS A:676 que são muito comuns (RIBAS et al., 2002; RINGER; SENENKO; SHERRILL, 2007; ZHAO et al., 2015). No composto representado pela figura 3, é possível ver além dessas interações não covalentes (π -S, π - π em forma de T e π -alquila), outras duas ligações nos aminoácidos LEU A:511 e ALA A:799 de mesma natureza química. É perceptível que esses compostos estabelecem interações não covalentes que, apesar de não serem as interações mais fortes, são interessantes por que podem contribuir para uma alta especificidade de ligação da molécula (LODISH et al., 2000).

4.5. Informações básicas sobre as moléculas obtidas como resultado.

Através do banco de dados utilizado para este estudo (NuBBE), foi possível obter informações sobre os sobre esses dois compostos e notou-se que ambos são pertencentes ao grupo dos Flavonóides que são substâncias naturais com estruturas fenólicas variáveis encontradas em plantas como metabólitos secundários e possuem diversas propriedades que são benéficas à saúde humana (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

A molécula resultado do programa FRED é conhecida como 3,3 – O – Dimetilquecertina e pode ser encontrada na planta *Siphoneugena densiflora* O. Berg que é achada nas regiões de Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo. Em algumas pesquisas, essa substância foi estudada para analisar propriedades inibitórias enzimáticas de alguns parasitas como *Trypanosoma cruzi* (GALLO et al., 2008).

O composto resultado do programa GOLD já recebe o nome de Flasciculiferina, é encontrado na *Acacia fasciculifera* e pode também ser identificado na *Iryanthera juruensis*, uma planta encontrada na região amazônica muito utilizada por índios do local para diversos fins. Por ser uma substância caracterizada como pertencente ao grupo dos flavonóides, esse composto também possui as propriedades antioxidantes (SILVA et al., 2007).

5. CONCLUSÃO:

Com os *softwares in silico* oferecidos pela área de conhecimento da bioinformática foi possível estudar sobre a proteína de replicação do vírus da dengue, por meio de um inibidor da NS5 foi possível gerar um modelo baseado em sua forma. Após a utilização de processos como triagem virtual, a ancoragem e a análise de Toxicidade gerou-se resultados satisfatórios como a obtenção de duas moléculas advindas de produtos naturais que, com o prosseguimento de estudos, podem ter potencial para serem futuros antivirais contra o DENV que ainda assola a população brasileira. Entretanto, há um longo caminho a ser percorrido e ainda é necessário que haja refinamento e melhoria dos compostos que foram apresentados nessa pesquisa. Estudos *in vitro* e *in vivo* ainda precisariam ser realizados para chegar a uma conclusão ainda mais respaldada e segura do funcionamento dessas moléculas em organismos vivos.

6. REFERÊNCIAS:

- BEZERRA, J. M. T. et al. Entry of dengue virus serotypes and their geographic distribution in Brazilian federative units: a systematic review. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, 2021.
- CANNALIRE, R. Functionalized 2,1-benzothiazine 2,2-dioxides as new inhibitors of Dengue NS5 RNA-dependent RNA polymerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1667–1676, 1 jan. 2018.
- GALLO, M. B. C. et al. Enzymatic Inhibitory Activity and Trypanocidal Effects of Extracts and Compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* Cham. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 63, n. 5–6, p. 371–382, 2008.
- GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, v. 2, n. 4, p. 24–36, 1 jul. 2008.
- GUO, C. et al. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 2017.
- HAWKINS, P. C. D. et al. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 572–584, 26 abr. 2010.
- LIM, S. P. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. **Antiviral Research**, v. 119, p. 57–67, 1 jul. 2015.
- LIM, S. P. et al. Potent Allosteric Dengue Virus NS5 Polymerase Inhibitors: Mechanism of Action and Resistance Profiling. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 8, p. e1005737, 2016.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, In Vitro Models for Selection of Development Candidates. v. 23, n. 1, p. 3–25, 15 jan. 1997.
- LODISH, H. et al. Noncovalent Bonds. **Molecular Cell Biology**. 4th edition, 2000.

MARINHO, P. E. S. ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Maytenus imbricata* CONTRA Flavivírus. p. 86, 2015.

MCGANN, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 578–596, 28 mar. 2011.

MENDONÇA, M. C. L. DE et al. Imported case of Dengue virus 3 genotype I in Rio de Janeiro state, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 8, 2018.

NAGATA, D. T. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DO DENGUE SOROTIPO-1 E DESENVOLVIMENTO DE cDNA INFECCIOSO. p. 126, 2009.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 29 dez. 2016.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v. 80, n. 1, p. 11–22, out. 2008.

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, 14 maio 2015.

RIBAS, J. et al. Theoretical study of alkyl- π and aryl- π interactions. Reconciling theory and experiment. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 20, p. 7057–7065, 4 out. 2002.

RINGER, A. L.; SENENKO, A.; SHERRILL, C. D. Models of S/ π interactions in protein structures: Comparison of the H₂S–benzene complex with PDB data. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 16, n. 10, p. 2216–2223, out. 2007.

SALMASO, V.; MORO, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

SILVA, D. H. S. et al. Lipoperoxidation and cyclooxygenases 1 and 2 inhibitory compounds from *Iryanthera juruensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2569–2574, 4 abr. 2007.

SLIWOSKI, G. et al. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 1 jan. 2014.

SOUSA, A. C. C. DE et al. Virtual screening as a tool to discover new β -haematin inhibitors with activity against malaria parasites. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 25 fev. 2020.

ZHAO, Y. et al. Conformational Preferences of π - π Stacking Between Ligand and Protein, Analysis Derived from Crystal Structure Data Geometric Preference of π - π Interaction. **Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences**, v. 7, n. 3, p. 211–220, set. 2015.

ANEXOS

IDENTIFICAÇÃO:	PESO MOLECULAR	LOGP	LIGAÇÕES ROTACIONÁVEIS	ACEPTORES	DOADORES	ÁREA DE SUPERFÍCIE
NuBBE_2369	370,401	3,0069	6	6	0	157,491
NuBBE_2370	384,428	3,0494	6	6	0	163,856
NuBBE_2371	386,444	3,2954	8	6	0	164,861
NuBBE_1152	248,366	4,1328	9	2	0	110,356
NuBBE_1556	302,326	2,2756	5	5	2	128,236
NuBBE_1793	300,439	3,1922	12	4	2	128,436
NuBBE_1664	461,399	-0,6219	5	11	5	186,146
NuBBE_1723	424,405	3,9896	3	8	0	176,492
NuBBE_1825	351,422	4,1581	4	4	0	153,625
NuBBE_178	312,321	3,4858	4	5	0	132,572

Tabela 4.1: Melhores moléculas na ancoragem feita pelo GOLD, demonstrando as regras de Lipinski.

IDENTIFICAÇÃO:	Teste de AMES	Inibidor hERG I	Inibidor hERG II	Hepatotoxicidade	Sensibilização da pele	Toxicidade - T.Pyriformis	LC 50 (peixes)
NuBBE_2369	Yes	No	No	No	No	0,41	-0,884
NuBBE_2370	Yes	No	No	No	No	0,404	-0,914
NuBBE_2371	Yes	No	No	No	No	0,443	-1,106
NuBBE_1152	No	No	No	No	Yes	2,162	-1,724
NuBBE_1556	Yes	No	No	No	No	0,923	0,494
NuBBE_1793	No	No	No	No	Yes	0,932	0,362
NuBBE_1664	No	No	Yes	No	No	0,285	3,704
NuBBE_1723	No	No	No	No	No	0,303	-0,442
NuBBE_1825	No	No	No	No	No	1,092	-0,116
NuBBE_178	No	No	No	No	No	0,447	0,14

Tabela 4.2: Melhores moléculas na ancoragem feita pelo GOLD, demonstrando as análises de toxicidade.

IDENTIFICAÇÃO:	Dose tolerada máxima	LD 50 (em ratos)	Toxicidade crônica em ratos por via oral
NuBBE_2369	0,382	2,476	1,394
NuBBE_2370	0,315	2,507	1,416
NuBBE_2371	0,564	2,399	1,426
NuBBE_1152	0,799	1,9	2,39
NuBBE_1556	-0,252	1,827	1,582
NuBBE_1793	0,465	1,758	2,353
NuBBE_1664	-0,257	2,226	3,296
NuBBE_1723	0,14	2,351	1,225
NuBBE_1825	0,371	2,427	1,956
NuBBE_178	0,493	2,272	1,06

Tabela 4. 3.: Melhores moléculas na ancoragem feita pelo GOLD, demonstrando as análises de toxicidade que são relativas a dose.

IDENTIFICAÇÃO:	PESO MOLECULAR	LOGP	LIGAÇÕES ROTACIONÁVEIS	ACEPTORES	DOADORES	ÁREA DE SUPERFÍCIE
NuBBE_1224	329,284	1,962	3	7	2	135,476
NuBBE_1787	315,257	1,659	2	7	3	128,792
NuBBE_1787	315,257	1,6106	2	7	3	129,146
NuBBE_2088	350,37	2,1611	3	5	0	151,161
NuBBE_2430	283,259	2,2478	2	5	1	119,203
NuBBE_2275	299,258	1,3293	1	6	2	125,082
NuBBE_2275	299,258	1,895	1	6	2	125,082

Tabela 5. 1.: Melhores moléculas na ancoragem feita pelo FRED, demonstrando as regras de Lipinski.

IDENTIFICAÇÃO:	Teste de AMES	Inibidor hERG I	Inibidor hERG II	Hepatotoxicidade	Sensibilização da pele	Toxicidade - T.Pyriformis	LC 50 (peixes)
NuBBE_1224	No	No	No	No	No	0,358	2,105
NuBBE_1787	No	No	No	No	No	0,328	2,497
NuBBE_1787	Yes	No	No	No	No	0,467	1,995
NuBBE_2088	No	No	No	No	No	1,366	-0,352
NuBBE_2430	No	No	No	No	No	0,6	0,297
NuBBE_2275	Yes	No	No	Yes	No	0,423	3,016

NuBBE_2275	Yes	No	No	Yes	No	0,457	2,59
------------	-----	----	----	-----	----	-------	------

Tabela 5.2: Melhores moléculas na ancoragem feita pelo FRED, demonstrando as análises de toxicidade.

IDENTIFICAÇÃO:	Dose tolerada máxima	LD 50 (em ratos)	Toxicidade crônica em ratos por via oral
NuBBE_1224	0,019	2,203	1,463
NuBBE_1787	0,401	2,256	1,599
NuBBE_1787	-0,191	1,832	1,751
NuBBE_2088	-0,399	2,132	1,497
NuBBE_2430	-0,186	2,008	1,193
NuBBE_2275	0,236	2,037	1,824
NuBBE_2275	0,213	2,121	2,045

Tabela 5. 3.: Melhores moléculas no docking feito pelo FRED, demonstrando as análises de toxicidade que são relativas a dose.