



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA**

MARCOS TÚLIO DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO POR qRMN E ANÁLISE *IN SILICO* DE
QUASSINOIDES ISOLADOS DE *Picrolemma sprucei* COMO
POTENCIAIS INIBIDORES DE PROTEASE SARS-CoV-2**

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

**MANAUS
2022**

MARCOS TÚLIO DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO POR qRMN E ANÁLISE *IN SILICO* DE
QUASSINOIDES ISOLADOS DE *Picrolemma sprucei* COMO
POTENCIAIS INIBIDORES DE PROTEASE SARS-CoV-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Inovação Farmacêutica da Universidade
Federal do Amazonas, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Inovação
Farmacêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

**MANAUS
2022**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586q Silva, Marcos Túlio da
Quantificação por qRMN e análise in silico de quassinoides isolados de *Picrolemma sprucei* como potenciais inibidores de protease SARS-CoV-2 / Marcos Túlio da Silva . 2022
53 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Quassinoides. 2. Caferana. 3. Docking molecular. 4. qRMN. 5. SARS-CoV-2. I. Nunomura, Rita de Cássia Saraiva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

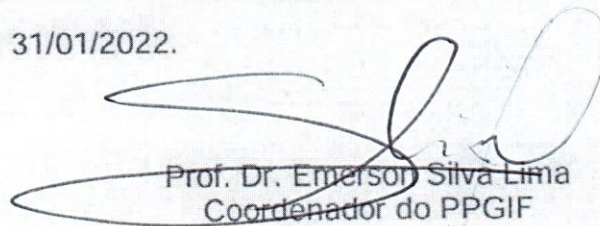
“Quantificação por qRMN e análise *in silico* de quassinoides isolados de *Picrolemma sprucei* como potenciais inibidores da SARS-CoV-2”

DISCENTE: MARCOS TULIO DA SILVA

PARECER:

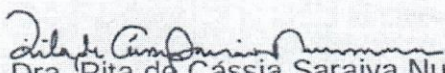
Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 31/01/2022.

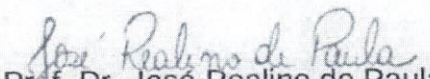


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGIF

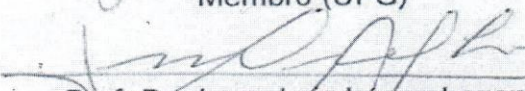
A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



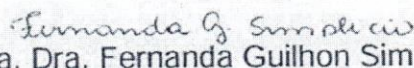
Profa. Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
orientadora e presidente da banca



Prof. Dr. José Realino de Paula
Membro (UFG)



Prof. Dr. Jorge Luis Lopez-Lozano
Membro (UNINORTE)



Profa. Dra. Fernanda Guilhon Simplicio
Membro (UFAM)



Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges
Membro (UEG)

Dedico esse trabalho à minha família e amigos. E com humildade, a mim mesmo.

AGRADECIMENTOS

“Maktüb”

À Deus, por estar comigo em todos os momentos mais difíceis. Tenho plena certeza de que Ele nunca me desamparou. A Ele por estar vivo. Poderia começar meus agradecimentos desde que cheguei à Manaus, mas, preciso escrever que se estou vivo hoje e escrevendo foi por Ele assim quis. Foram seis anos de muitas lutas, mas, a maior delas foi sobreviver a COVID-19. Internado, sem família em Manaus e só com amigos me dando suporte e sem expectativas de vacinas, fiquei com medo de perder a vida. Sobrevivi! E vivo para poder contar que Ele assim quis! Maktüb!

A minha família em Goiânia. Papai (Marcos), mamãe (Ester), minha irmã (Cris) e meu lindo sobrinho Miguel. Titio não te conhece pessoalmente, mas deixo aqui eternizado meu amor por você, logo, logo titio estará aí. Por vocês nunca desistirem de mim. Por investir na minha educação para que eu pudesse ir longe. A saudade é a memória do coração, fazendo com que todos os dias a gente se lembre do nosso propósito. Óbvio que não sou o filho perfeito, ainda há questões que é difícil para vocês compreenderem, mas, estou sempre tentando ser pedagógico. As pessoas mudam e os filhos também e parece ser doloroso. Amo vocês de todo meu coração. Obrigado por sempre puxarem a minha orelha. Faço tudo por vocês. Chegamos juntos a reta final. AMO VOCÊS!

Preciso agradecer de todo meu coração a minha amiga Jésika Maria, meu amigo José e sua família. Conheci Jésika em 2014, ainda fazendo mestrado no Qbioma (bons tempos e perrengues rs). Foi um encontro de irmãos (assim nos chamamos). Jésika junto com a família me adotaram, seu Zé e dona Tânia se tornaram meus pais postíços com carinho e cuidado sempre lembram de mim em orações. Poderia colocar inúmeros momentos memoráveis pelos quais passamos, mas, vou deixar para a memória do coração. A família vai aumentar. Dimitri você já é amado por todos. E seus pais são incríveis. A vocês todos minha eterna gratidão!

Deixo a minha eterna gratidão ao Lucas Campos. Conheci o Lucas em 2015 num contexto religioso ainda, mas ele disse quando fui embora “Ei, se tu voltares pra Manaus, vamos dividir um local pra um ajudar ao outro”. Retorno pra Manaus, sem expectativa de emprego ou bolsa do doutorado Lucas resolve me dar um lugar no pequeno espaço no qual ele morava. Tentei de diversas formas nunca ser um peso. Lucas nunca vou esquecer de quando você comprou para mim um pacote de cuecas e não tenho vergonha nenhuma de falar, a minha situação não era das melhores. Cara, você tem um coração muito generoso, gratidão. Através de você conheço Wilker e Jessica. Obrigado também por tudo que fizeram por mim. Por me ajudarem financeiramente, com alimentação. Entre várias outras coisas. Gratidão!

Aos meus amigos de Manaus (que são muitos), gostaria de colocar “todes” aqui, mas, saibam que moram em meu coração.

Aos amigos que a vida acadêmica me deu. Ao pessoal da Central Analítica. E todos que cruzaram meu caminho que de alguma forma contribuíram para esse trabalho. Em especial a Rochelly meu muito obrigado.

Ao meu amigo Matheus Gabriel minha eterna gratidão, palavras são poucas para poder externalizar gratidão. Obrigado por me ajudar tanto com esse trabalho.

Ao meu amigo Kidney. Gratidão também por me ajudar tanto com esse trabalho.

“Aos Mestres ... “Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” Cora Coralina.

À minha orientadora, Profa. Dr^a. Rita Nunomura. Obrigado pela paciência comigo.

À professora Dr^a. Antônia pela generosidade.

À professora Dr^a. Fernanda Guilhon gratidão por tudo!

Ao professor Dr. Marcos Machado.

Ao professor Dr. Ari de Freitas Hidalgo

À pessoa do Prof. Dr. José Realino. Tudo que eu disser aqui será pouco da grandeza e bondade que carrega em sua alma. Gratidão professor!

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de aprimoramento.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

“Nunca deixe de acreditar nos seus sonhos ainda que singelos. Eles são a força motriz que te impulsionam chegar a lugares inimagináveis.” Marcos Túlio

RESUMO

Logo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a doença de Coronavírus 2019 (COVID-19) como uma infecção pandêmica, importante síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), proteínas não-estruturais (Nsp) foram analisadas como alvos promissores em abordagens de triagem virtual utilizando técnicas *in silico*, como docking molecular. Entre essas proteínas estão a cisteína protease do tipo 3-quimotripsina (3CLpro), também chamada de protease principal, e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que foram identificadas como alvos devido à sua importância nas etapas de replicação viral. Existe um grande interesse na busca de novas substâncias que possam ser candidatos a novos fármacos no tratamento da COVID-19, e as plantas medicinais continuam sendo uma fonte riquíssima na busca de novos fármacos. A espécie *Picrolemma sprucei*, conhecida popularmente na Amazônia como “caferana”, é muito utilizada na região como um antimalárico. Pesquisas anteriores das raízes e folhas de *P. sprucei* resultaram no isolamento dos principais quassinoides dessa espécie, neosergeolida e isobruceína B. Estudos *in vitro* dessas substâncias relataram atividades antitumoral, antimalárica, anti-helmíntica, inseticida. Neste sentido o presente trabalho teve como objetivo quantificar os quassinóides de *P. sprucei*, uma planta medicinal nativa da região amazônica, usando qRMN, e investigar o potencial inibitório da isobruceína B e neosergeolida nos alvos 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2 por meio de abordagens *in silico*. A quantificação foi realizada em uma fração (F2-F3) enriquecida com os quassinóides isobruceína B e neosergeolida pelo método PULCON. Os ensaios *in silico* foram realizados por meio de docking molecular para avaliar as interações e afinidade de ligação entre os ligantes neosergeolida e isobruceína B com os alvos 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2 e servidores online foram utilizados para estimar os parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade. Foi possível determinar a quantidade em mg dos dois quassinoides isobruceína B e neosergeolida na fração F2-F3 (769,6 mg), presentes em quantidades significativas no extrato PsMeOH (5,46%). Os resultados da análise de docking, com base nas estruturas cristalizadas de RdRp e 3CLpro, indicou isobruceína B e neosergeolida indicou que isobruceína B e neosergeolida são inibidores potenciais das duas proteínas avaliadas, bem como mostrou a importância da ligação de hidrogênio e interações pi (π) para os sítios ativos previstos para cada alvo. Os resultados sugerem que os quassinóides de *P. sprucei* podem interagir com os alvos 3CLpro e RdRp. Experimentos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar os resultados de docking molecular e investigar os riscos de *P. sprucei* como planta medicinal contra a COVID-19.

Palavras-chave: Quassinoides; Caferana; Docking molecular; qRMN; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

As soon as the World Health Organization (WHO) declared Coronavirus disease 2019 (COVID-19) as a pandemic infection, major severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), non-structural proteins (Nsp) were analyzed as promising targets in virtual screening approaches using *in silico* techniques, such as molecular docking. Among these proteins is 3-chymotrypsin-like cysteine protease (3CLpro), also called the major protease, and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), which have been identified as targets because of their importance in viral replication steps. There is great interest in the search for new substances that may be candidates for new drugs in the treatment of COVID-19, and medicinal plants continue to be a very rich source in the search for new drugs. The specie *Picrolemma sprucei*, popularly known in the Amazon as caferana, is widely used in the region as an antimalarial. Previous investigations of *P. sprucei* roots and leaves resulted in the isolation of the main quassinoids of this species, neosergeolide and isobrucein B. *In vitro* studies of these substances have reported antitumor, antimalarial, anthelmintic, insecticidal activities. In this context, the present work aimed to quantify the quassinoids of *P. sprucei*, a medicinal plant that is native to the Amazon region, using qNMR and investigate the inhibitory potential of isobrucein B and neosergeolide on the 3CLpro and RdRp targets of SARS-CoV-2 through *in silico* approaches. The quantification was performed in a fraction (F2-F3) enriched with the quassinoids isobrucein B and neosergeolide using the PULCON method. *In silico* assays were performed using molecular docking to assess interactions and binding affinity between neosergeolide and isobrucein B ligands with SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp targets, and online servers were used to estimate pharmacokinetic and toxicity. It was possible to determine the quantity of the two quassinoids isobrucein B and neosergeolide in the F2-F3 fraction (769.6 mg), which were present in significant amounts in the PsMeOH extract (5.46%). The results of the docking analysis, based on the crystallized structures of RdRp and 3CLpro, indicated that isobrucein B and neosergeolide are potential inhibitors of the two proteins evaluated, as well as showing the importance of hydrogen bonding and pi (π) interactions for the active sites foreseen for each target. The results suggest that *P. sprucei* quassinoids may interact with 3CLpro and RdRp targets. *In vitro* and *in vivo* experiments are needed to confirm the results of molecular docking and investigate the risks of using *P. sprucei* as a medicinal plant against COVID-19.

Keywords: Quassinoids; Caferana; Molecular Docking; qNMR; SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição de ensaios clínicos relacionados aos produtos naturais em todo mundo. Os números indicam a quantidade de estudos em cada região no momento da busca.	16
Figura 2. Mapa de distribuição de ensaios clínicos relacionados aos produtos naturais e SARS-CoV-2 em todo mundo. Os números indicam a quantidade de estudos em cada região no momento da busca.	16
Figura 3. Folhas, flores, frutos, caules e raízes de <i>P. sprucei</i>	19
Figura 4. A distribuição geográfica brasileira de <i>P. sprucei</i>	19
Figura 5. Quassinóides isolados de <i>P. sprucei</i>	20
Figura 6. Triagem virtual de novos ligantes por meio de docking molecular	22
Figura 7. Localização Geográfica do espécime <i>P. sprucei</i> coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Fonte: Google Earth.	26
Figura 8. Folhas, caules e raízes de <i>P. sprucei</i> coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke	27
Figura 9. Moinho de facas utilizado para processar as raízes de <i>P. sprucei</i>	27
Figura 10. Fluxograma da obtenção do extrato bruto metanólico de pó de raiz de <i>P. sprucei</i>	28
Figura 11. Espectros de massa das frações F2 e F3 da coluna de fracionamento do extrato de PsMeOH Próprio Autor.	33
Figura 12. Espectro MS/MS do íon m/z 481 ($[M+H]^+$), isobruceína B, presente nas frações F2 e F3	34
Figura 13. Espectro MS/MS do íon m/z 505 ($[M+H]^+$), neosergeolida, presente nas frações F2 e F3	34
Figura 14. Espectro quantitativo de 1H NMR da réplica 1 da mistura de isobruceína B - neosergeolida. A quantificação por qRMN foi realizada para os sinais δ 5,75 (neosergeolida) e δ 6,03 (isobruceína)	35
Figura 15. Análise de redocking. Sobreposição da estrutura cristalográfica do inibidor X77 (átomos de carbono em amarelo) e as dez orientações mais pontuadas obtidas por docking. Próprio Autor.	38
Figura 16. (A) docking molecular em 3D do X77 (átomos de carbono em roxo) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 3CLpro, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação 2D entre o X77 e os resíduos do receptor. Próprio Autor.	39
Figura 17. (A) docking molecular em 3D da isobruceína B (átomos de carbono em ciano) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 3CLpro, destacando as principais interações	

intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da isobruceína B e os resíduos do receptor. Próprio Autor.....40

Figura 18. (A) docking molecular em 3D da neosergeolida (átomos de carbono em amarelo) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 3CLpro, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da neosergeolida e os resíduos do receptor. Próprio Autor.....40

Figura 19. A) docking molecular 3D da isobruceína B (átomos de carbono em ciano) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da isobruceína B e os resíduos do receptor. Próprio Autor.42

Figura 20. (A) docking molecular em 3D da neosergeolida (átomos de carbono em amarelo) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 RdRp, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da neosergeolida e os resíduos do receptor. Próprio Autor.....42

Figura 21. (A) docking molecular em 3D da teaflavina (átomos de carbono em cinza) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 RdRp, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da teaflavina e os resíduos do receptor. Próprio Autor.43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas e dimensões dos gridboxes para a enzima 3CLpro (PDB ID:6W63)	32
Tabela 2. Coordenadas e dimensões dos gridboxes para a enzima RdRp (PDB ID:6M71)....	32
Tabela 3. Massa de cada um dos quassinóides presentes na fração F2-F3 e no extrato PsMeOH	35
Tabela 4. Parâmetros ADME calculados dos quassinóides e inibidores SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp	36
Tabela 5. Cálculo dos parâmetros de toxicidade dos quassinoides e inibidores de SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp.....	37
Tabela 6. Predição de afinidade de ligação, energias intermoleculares e interações com os resíduos de aminoácidos da isobruceína B, neosergeolida e re-docking do inibidor X77 com o sítio de ligação do SARS-CoV-2 3CLpro	39
Tabela 7. Predição de afinidade de ligação, energias intermoleculares e interações com os resíduos de aminoácidos da isobruceína B, neosergeolida e do inibidor teaflavina com o sítio de ligação do SARS-CoV-2 RdRp	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Covid-19/SARS-CoV-2	14
1.2 Produtos naturais	15
1.2.1 Plantas Medicinais	17
1.2.2 A família Simaroubaceae	17
1.2.3 A espécie <i>Picrolemma sprucei</i> Hook	18
1.6.4 Estudo químico e atividade biológica de <i>P. sprucei</i> Hook	20
1.3 Métodos utilizados no planejamento racional de fármacos	21
1.3.1 Docking molecular	21
1.3.2 Propriedades farmacocinéticas e toxicidade (ADME/Tox)	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Coleta do material vegetal	26
3.2 Processamento do Material Vegetal	26
3.3 Preparação do extrato metanólico das raízes de <i>P. sprucei</i>	27
3.4 Estudo fitoquímico	28
3.5 Análise de frações obtidas a partir do fracionamento do extrato de PsMeOH por espectrometria de massa (MS)	29
3.6 Identificação e quantificação de quassinóides pelo método PULCON	29
3.7 Análise estatística	30
3.8 Estudos de docking molecular dos quassinóides e alvos de SARS-CoV-2	30
3.8.1 Estruturas químicas	30
3.8.2 Predições farmacocinéticas	31
3.8.3 Predições de toxicidade	31
3.8.4 Simulações de docking molecular – Preparação dos ligantes	31
3.8.5 Preparação das proteínas	31
3.8.6 Cálculos de docking molecular	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4. CONCLUSÃO	45
5. REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Covid-19/SARS-CoV-2

A pandemia de coronavírus SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda grave do Coronavírus 2) surgiu em Wuhan, China, com as primeiras infecções sendo relatadas em dezembro de 2019. Devido à sua rápida disseminação, até o mês de janeiro de 2022, mais de 326 milhões de casos da doença foram registrados em todo o mundo, e as mortes já ultrapassam cinco milhões de pessoas (Organização Mundial da Saúde [OMS], 2022). Representando um desafio sem precedentes, uma extensa pesquisa sobre o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais para o COVID-19 identificou alvos potenciais que desempenham um papel importante no bloqueio da infecção viral (GHAHREMANPOUR et al., 2020).

Grupos de pesquisa chineses sequenciaram o genoma do SARS-CoV-2 e suas proteínas não-estruturais (NSP), incluindo o proteína spike, protease de cisteína semelhante a 3-quimotripsina (3CLpro), também chamada de protease principal (Mpro), protease semelhante a papaína (PLpro) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (ZHU et al., 2019; MORSE et al., 2020). O papel da proteína é ligar o vírus no receptor humano – uma metalopeptidase chamada enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2), enquanto 3CLpro e PLpro fornecem componentes para empacotar novos vírions de grandes poliproteínas virais traduzidas no ribossomo hospedeiro e, finalmente, RdRp replica o genoma do RNA SARS-CoV-2 (MORSE et al., 2020).

Os alvos 3CLpro e RdRp têm grande importância na replicação viral do SARS-CoV-2 e se destacam como essenciais alvos em estratégias computacionais, como docking molecular (QAMAR et al., 2020; WU et al., 2020; DAS et al., 2020; YU et al., 2020). O docking molecular está sendo usado para triagem de novos agentes antivirais contra o COVID-19 e permite entender como esses NSPs são alvos importantes do SARS-Cov-2 e como eles irão interagir com ligantes no sítio ativo (QAMAR et al., 2020; WU et al., 2020; DAS et al., 2020; YU et al., 2020; HASAN et al., 2020).

Em relação aos ligantes, medicamentos já em uso clínico e produtos naturais presentes em plantas medicinais, têm sido usados como candidatos em abordagens de triagem virtual. (DA SILVA et al., 2020; NEVES et al., 2021). Nesse sentido, os quassinoides são potenciais candidatos em abordagens de triagem virtual na busca de novos agentes contra a COVID-19 (HASAN et al., 2020; QAMAR et al., 2020; HASAN et al., 2020).

1.2 Produtos naturais

A utilização de produtos naturais obtidos de plantas, fungos e microrganismos tem sido base de tratamentos para o alívio, e cura de enfermidades nas civilizações chinesas, indianas e egípcias por milhares de anos e continua como base dos tratamentos médicos no mundo ocidental (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Um estudo de Newman e Cragg (2020), revelou que entre os anos de 1981 e 2019, 46,7% dos fármacos aprovados eram de produtos naturais ou derivados. Fazendo uma busca sobre “produtos naturais” no site “Clinical Trial” resulta em 400.999 estudos relacionados a produtos naturais.

A figura 1 representa o mapa de distribuição dos ensaios clínicos utilizando produtos naturais no mundo na data acessada. Vale lembrar que a maioria dos estudos que estão cadastrados se concentram nos Estados Unidos e Europa, o que mostra ser quase inversamente proporcional a diversidade biológica de fauna e flora. A figura 2 representa o mapa de distribuição dos ensaios clínicos utilizando produtos naturais e SARS-CoV-2 (7295 estudos) no mundo na data acessada.

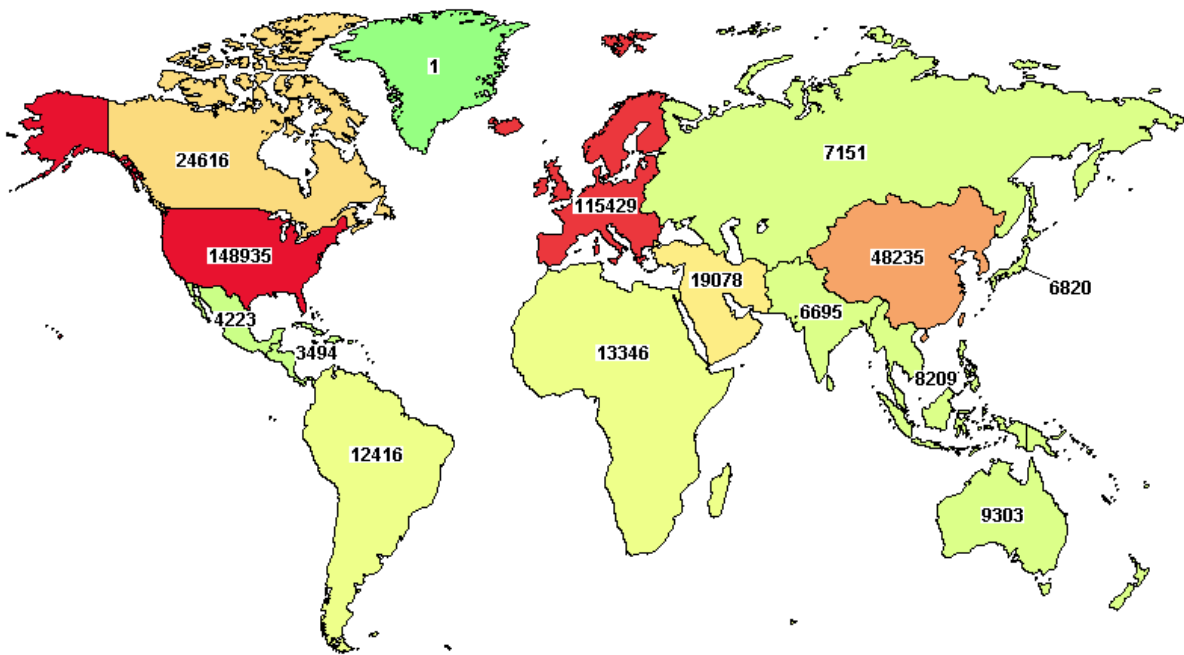


Figura 1. Mapa de distribuição de ensaios clínicos relacionados aos produtos naturais em todo mundo. Os números indicam a quantidade de estudos em cada região no momento da busca. **Fonte:** <https://ClinicalTrials.gov>, acesso em janeiro de 2022).

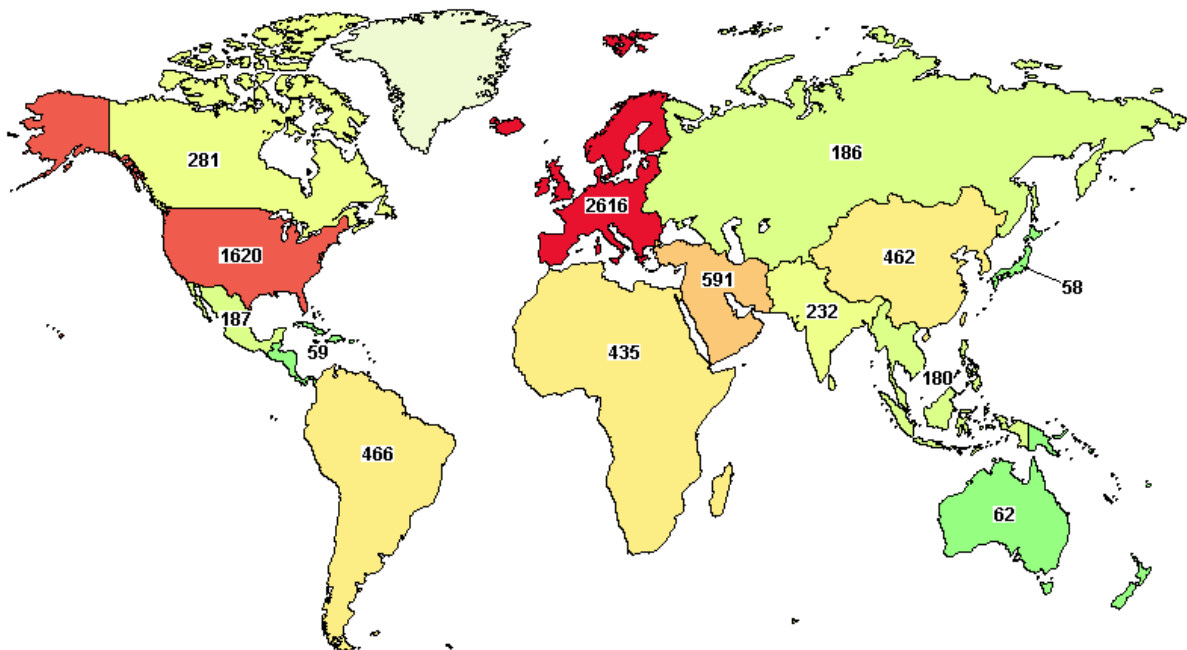


Figura 2. Mapa de distribuição de ensaios clínicos relacionados aos produtos naturais e SARS-CoV-2 em todo mundo. Os números indicam a quantidade de estudos em cada região no momento da busca. **Fonte:** <https://ClinicalTrials.gov>, acesso em janeiro de 2022).

1.2.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais têm sido terapia alternativa para tratar inúmeras enfermidades, constituindo como uma prática comum do ser humano há milhares de anos antes de Cristo (VASCONCELOS et al., 2005; VEIGA JR et al., 2005).

Sharma e Sarkar (2013) em seu estudo, relata que aproximadamente 60% das substâncias testadas em ensaios clínicos fazem parte de apenas 10 famílias taxonômicas: Fabaceae, Asteraceae, Apiaceae, Rosaceae, Solanaceae, Poaceae, Lamiaceae, Rutaceae, Brassicaceae e Amaryllidaceae.

Interpretando os dados disponíveis, observa-se que a grande parte das espécies de plantas não foram sistematicamente investigadas na busca por substâncias bioativas, até mesmo espécies bastante reconhecidas no uso na medicina tradicional carecem de uma maior exploração. Aliás, muitas pesquisas não têm continuidade quanto aos mecanismos de ação das moléculas, sendo em sua maioria, apenas descrição das atividades (SHARMA; SARKAR, 2013; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

O Brasil, contém uma das maiores biodiversidades do planeta, englobando em torno de 20% das espécies do mundo, estimando-se em números de 350.000 à 550.000 exemplares que fazem parte da flora medicinal e dentre estas, 55.000 estão catalogadas e distribuídas nas diversas regiões do país fazendo parte muitas vezes, das únicas opções terapêuticas em determinadas regiões (GUERRA; NODARI, 2007; RIBEIRO et al., 2014).

Assim, a flora brasileira proporciona à população menos privilegiada, plantas medicinais que podem ser alternativas terapêuticas mais baratas, por não terem acesso fácil a medicamentos, grande parte da população incluindo tribos indígenas, quilombolas e ribeirinhos comunidades da Amazônia recorrem ao uso de plantas medicinais, que na maioria das vezes são a única fonte de remédio para o tratamento ou cura de doenças (LE COINTE, 1947; VEIGA-JR et al., 2005; DA SILVA et al., 2020).

1.2.2 A família Simaroubaceae

De acordo com Ribeiro e colaboradores (1999) a família Simaroubaceae tem cerca de 25 gêneros e 200 espécies com centro de diversidade na região neotropical. No campo, costuma ser confundida com Meliaceae, Sapindaceae, Anacardiaceae e outras famílias da Ordem Sapindales. Os gêneros de Simaroubaceae existentes no Brasil são: *Castela*, *Picrasma*, *Picrolemma*, *Quassia*, *Simaba* e *Simarouba* (SOUZA, 2008).

Plantas da família Simaroubaceae são utilizadas na medicina tradicional no tratamento da malária, câncer, disenteria, como anti-inflamatórias, antileucêmicas, fago-inibidora em insetos, antiviral (POLONSKY, 1985; OKANO et al., 1996; MILLIKEN, 1997; ARRAIGA et al, 2002; OKUNADE et al, 2003; MUHAMMAD et al, 2004, SARAIVA, 2001; NUNOMURA, 2006). O interesse econômico da família concentra-se no uso medicinal das espécies que tem sido fonte de muitas substâncias amargas conhecidas como quassinoides. Estas classes de substâncias são consideradas marcadores taxonômicos desta família (SARAIVA, 2003).

As espécies dessa família são arbustos ou árvores, suas folhas são alternas ou muito raramente opostas, compostas pinadas ou raramente simples, sem estípulas, margem inteira ou serrada. Inflorescência geralmente cimosa, suas flores pouco vistosas, unicelulares ou raramente bissexuadas, actinomorfas, diclamídeas ou dificilmente monoclamídeas. Fruto são geralmente apocárpico, drupáceo ou samaróide. Os frutos são subcarnosos, de cores vivas quando maduros, alaranjados, rubros e enegrecidos. (SOUZA, 2008).

1.2.3 A espécie *Picrolemma sprucei* Hook

A *P. sprucei* Hook é uma planta nativa da Região Amazônica e sua sinonímia é *P. pseudocoffea* Ducke. É conhecida popularmente no Brasil como “caferana” (NUNOMURA et al., 2006; POHLIT et al, 2009b; RIBEIRO et al, 1999) devido à sua semelhança com a *Coffea arábica* L. (Rubiaceae). No Peru, é conhecida popularmente como Sacha-café (DUKE; VASQUEZ, 1994) e na Guiana Francesa como café Iane (VIGNERON et al, 2005).

A *P. sprucei* (Figura 12) é um arbusto com a altura variando até 2,5 m, com folíolos cartáceos simétricos, verdes-escuros e brilhantes. Suas inflorescências apresentam flores alaranjadas e estames amarelos. Os caules são ocos e habitados por formigas. A raiz é central, espessa e penetrante. Os frutos são apocárpico (Figura 3), de cor alaranjada quando maduros (RIBEIRO et al., 1999; SARAIVA, 2001). A distribuição geográfica brasileira de *P. sprucei* é no norte do país, nos Estados do Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia (PIRANI; THOMAS, 2015) (Figura 4).



Figura 3. Folhas, flores, frutos, caules e raízes de *P. sprucei*
Próprio Autor.



Figura 4. A distribuição geográfica brasileira de *P. sprucei*
Fonte: PIRANI, J.R.; THOMAS, W.W. 2015

1.6.4 Estudo químico e atividade biológica de *P. sprucei* Hook

O uso popular da caferana pela população amazônica é bastante conhecido, o chá do caule usado no tratamento da malária. Na Amazônia brasileira, pode ser encontrado para compra em feiras, como Mercado Municipal Adolpho Lisboa em Manaus, por meio de raizeiros interior do Estado (RIBEIRO et al., 1999, FERREIRA, 2000).

Por fazer parte da família Simaroubaceae, os principais constituintes da *P. sprucei* são os quassinóides, produzidos somente por espécies dessa família. Os quassinóides são triterpenos biodegradados, altamente oxigenados com uma ampla faixa de atividades biológicas. A primeira substância isolada dessa classe foi de uma espécie do gênero *Quassia*, vindo daí o termo “quassinóide”.

Pesquisas anteriores com as raízes e folhas de *P. sprucei* resultaram no isolamento dos principais quassinóides dessa espécie, neosergeolida e isobruceína B apresentadas na Figura 5 (MORETTI et. al., 1982; ZUKERMAN-SCHPECTOR; CASTELLANO, 1994, VIEIRA et. al., 2000, SARAIVA, 2001, AMORIM, 2009).

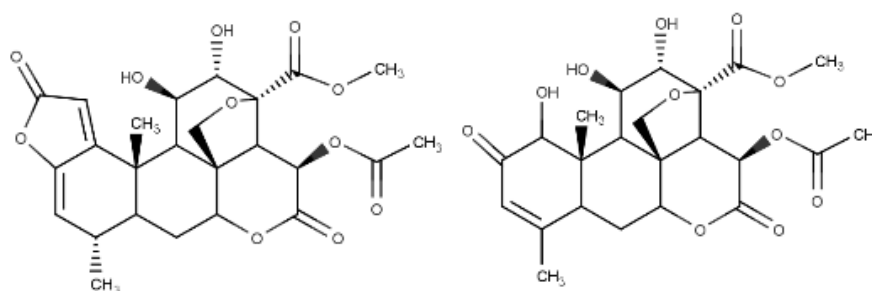


Figura 5. Quassinóides isolados de *P. sprucei*

Posteriormente, a presença dessas substâncias no caule e na raiz da planta foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (POHLIT, et. al., 2009). Silva e colaboradores (2009b) descreveram um novo método para obtenção de isobruceína B e neosergeolida por recristalização.

Nunomura e colaboradores (2006) demonstraram atividade anti-helmíntica *in vitro* da isobruceína B e da neosergeolida isolados da fração clorofórmica de *P. sprucei* contra *Haemonchus contortus*, um nematóide que parasita o sistema gastrointestinal de carneiros e outros animais. Outros estudos *in vitro* relatam atividades antitumoral, antimalárica, anti-

helmíntica, citotóxica, inseticida e anti-leishmania da neosergeolida e da isobruceína B (FUKAMIYA, et. al, 2005; ALMEIDA et al, 2007; ANDRADE-NETO, et. al., 2007; SILVA et al, 2009b).

1.3 Métodos utilizados no planejamento racional de fármacos

O planejamento baseado na estrutura química é a metodologia mais eficiente e menos onerosa para se desenvolver novos candidatos a fármacos, sendo capaz de auxiliar em todas as etapas do processo, da descoberta de protótipos (conhecidos também como compostos de partida ou do inglês “lead compounds”), bem como otimizar (verificando afinidade, especificidade, efeitos colaterais) até a fase clínica do processo de planejamento e desenvolvimento de um novo fármaco (OPREA, 2005).

Existem diversas estratégias no processo de planejamento de fármacos, dentre elas destaca-se o planejamento auxiliado por computadores (CAAD, do inglês Computer-Aided/Assisted Drug Design) (JORGENSEN, 2004).

Tais métodos computacionais ajudam a identificar candidatos a protótipos de fármacos de forma ágil e menos custosa bem como o fato da minimização da utilização de animais de laboratório. Nos últimos anos, a tecnologia vem aumentando nas áreas de software e hardware, e tem-se notado avanços importantes (JORGENSEN, 2009).

O que torna ainda mais atrativo tal abordagem, é a utilização de proteínas, já que o conhecimento de aproximadamente 80% dos fármacos atuais tem como alvos essas macromoléculas. No ano de 2006, foi estimado um aumento em torno de 7 % no número de proteínas depositadas no banco de dados de proteínas PDB (PROTEIN DATA BANK) e que cerca de 1000 novas estruturas sejam depositadas a cada ano (OPREA, 2005; BAJORATH, 2012).

1.3.1 Docking molecular

Dentre as diversas ferramentas computacionais que auxiliam no planejamento de fármacos, destaca-se o docking molecular (Figura 6). Essa técnica de abordagem *in silico* baseia-se no acoplamento molecular de substâncias químicas (ligantes) nos sítios ativos de ligação das macromoléculas (proteínas, DNA, etc.) (SHOICHET, 2004).

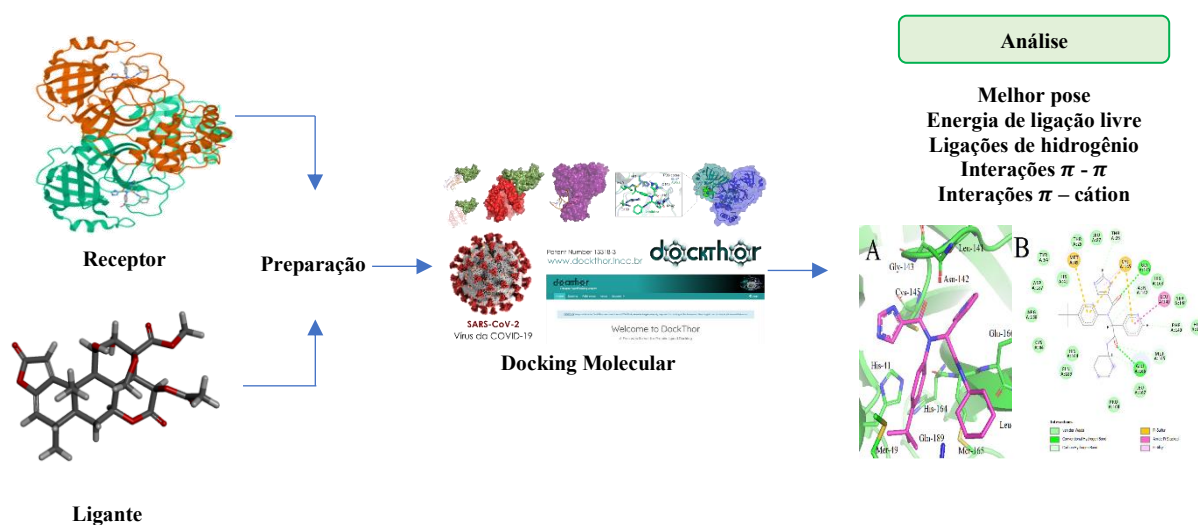


Figura 6. Triagem virtual de novos ligantes por meio de docking molecular
Próprio Autor.

O docking molecular definirá qual a orientação preferencial de uma molécula com a proteína na formação de complexos estáveis com energia mínima. Quanto mais negativo o ΔG° , mais estável será o complexo enzima-inibidor ou proteína-ligante. O acoplamento do ligante no receptor, por sua vez, pode ser usado para prever a afinidade de ligação, e quais tipo de interação esse ligante faz com o receptor (LENGAUER; RAREY, 1996).

As propriedades estruturais, tais como orientação, posição espacial e rotações de ligações covalentes, definem os arranjos espaciais moleculares. As físico-químicas, tais como forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações covalentes, definem o grau de afinidade e especificidade entre o ligante e receptor (MORGON; COUTINHO, 2007)

Uma das características mais interessantes do docking molecular, está na sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando como uma forma de validar o mesmo. Para realizar um teste nesse nível, o ligante que veio co-cristalizado na macromolécula é retirado de seu complexo e submetido a simulações com o sítio ligante da proteína. Desse modo, as interações químicas obtidos nas simulações são comparados com as respectivas interações obtidas experimentalmente (VERDONK, M.L. et al., 2003).

O docking molecular pode através de sua função de escore, classificar os ligantes de acordo com valores experimentais de atividade. Tal correlação pode ser feita por meio dos valores de escore obtidos nas simulações e os valores experimentais de atividade (OPREA, 2005).

1.3.2 Propriedades farmacocinéticas e toxicidade (ADME/Tox)

Grande parte dos fármacos que entram nas fases clínicas não chegam ao mercado, sendo que cerca de 50 % das falhas ocorrem porque há falta de eficácia, 25% dos problemas ocorrem por problemas farmacocinéticos e de toxicidade e 15 % por outras dificuldades (PLENGE, et. al., 2013). A falha na eficácia é devido ao fato de modelos experimentais com animais não corresponderem à biologia do homem e as falhas na toxicidade estão atreladas a interações com alvos biológicos indesejáveis (WOLBER, 2006).

Anteriormente a potência e seletividade de candidatos a fármaco eram otimizados primeiro e somente depois as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas. Nos dias atuais, tanto a farmacocinética quanto a farmacodinâmica precisam ser otimizadas concomitantemente no início do processo da descoberta e planejamento de novos fármacos (OPREA, 2005).

Tal mudança de paradigma sofreu influência com a “regra dos cinco” de Lipinski (Ro5, do inglês Rule of five) elencando parâmetros favoráveis à absorção e permeabilidade de compostos, sendo: ≤ 5 doadores de ligação de hidrogênio; ≤ 10 aceptores de ligação de hidrogênio; peso molecular ≤ 500 Da; e $\log P \leq 5$ (LIPINSKI, 1997).

Contudo, cerca de 20% dos fármacos que são absorvidos por via oral, não seguem pelo menos uma das regras sugeridas por Lipinski, reduzindo a abordagem de aplicação de filtros moleculares retirando compostos que não seguem essas regras no início do desenvolvimento de novos fármacos. Todavia, como esse processo é bastante dispendioso e muito complexo, uma triagem prévia de propriedades que possam ir além de propriedades farmacodinâmicas, diminui riscos de falha nos estágios mais avançados ou mesmo quando esse fármaco já está no mercado (OVERINGTON, et. al., 2006; LIPINSKI, 2012).

Devido à complexidade dos organismos biológicos, fazer uma triagem de todos os alvos biológicos parece uma árdua tarefa. Entretanto, há uma série de alvos moleculares, chamados anti-alvos, nos quais a interação é normalmente indesejada porque leva a efeitos adversos e toxicidade. Um dos anti-alvos mais conhecidos é o canal de potássio hERG (do inglês, human Ether-à-go-go Related Gene) que se inibido pode levar a arritmias cardíacas fatais, como a *Torsades de points* (VANDENBERG, et. al., 2012).

Outras propriedades importantes podem ser avaliadas previamente, como: biodisponibilidade, permeabilidade pela barreira hematoencefálica, solubilidade em meio aquoso, mutagenicidade, entre outras. As propriedades farmacocinéticas, absorção, distribuição, metabolismo e excreção, juntamente com toxicidade (ADME/Tox) podem ser avaliadas *in silico* também como alternativa para métodos *in vitro* e *in vivo* já que esses métodos

ainda são caros e demandam tempo, sem contar a pressão política e pública com respeito ao uso de animais em laboratório (GLEESON, 2008; XU, et. al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho foi realizar a quantificação dos quassinoides de *P. sprucei* e o estudo teórico dos quassinoides contra alvos da SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar os quassinoides de *P. sprucei* por qRMN;
- Avaliar o potencial de inibição *in silico* dos quassinoides para as enzimas 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2;
- Realizar predições *in silico* de parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade dos quassinoides de *P. sprucei*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal foi coletado em fevereiro de 2018 na Reserva Florestal Adolpho Ducke na cidade de Manaus, Brasil sob coordenadas geográficas (02° 54' 48,2'' S, 59° 58' 49,2'' W) (Figura 7) após obter autorização da Autorização de Biodiversidade e Sistema de Informação (SISBIO n° 46383). A identificação botânica da espécie como *Picrolemma sprucei* Hook.f. foi realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela botânica Mariana Rabello Mesquita. A exsicata da planta encontra-se no herbário INPA identificada com o número 279918. O acesso ao patrimônio genético foi registrado (AE76F92) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (SisGen).



Figura 7. Localização Geográfica do espécime *P. sprucei* coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Fonte: Google Earth.

3.2 Processamento do Material Vegetal

O material vegetal (Figura 8) foi seco em estufa de circulação de ar à 40°C até a completa secagem. Após a secagem, o material foi então separado em raízes, caules (talos) e folhas e frutos. A parte de interesse do trabalho, as raízes, foram picotadas em pedaços de cerca de 10 cm, com tesoura de poda e machadinha, seguido de moagem fina em moinho de facas (Figura 9) para a obtenção de serragem (302,54 gramas).



Figura 8. Folhas, caules e raízes de *P. sprucei* coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke
Próprio Autor.



Figura 9. Moinho de facas utilizado para processar as raízes de *P. sprucei*
Próprio Autor.

3.3 Preparação do extrato metanólico das raízes de *P. sprucei*

O pó de raiz de *P. sprucei* (302,54 g) foi submetido à maceração a frio (2 semanas) (Figura 10) com hexano (1,0 L) com auxílio de ultrassom para remover substâncias apolares. Este material foi posteriormente extraído com metanol (1,0 L) via maceração à frio. O extrato metanólico de pó de raiz de *P. sprucei* (PsMeOH) foi obtido por maceração a frio exaustiva (3 semanas). O PsMeOH foi concentrado em rotaevaporador (Fisatom[®]801) a uma temperatura de

40°C para remover todo o solvente. Após a completa secagem do extrato PsMeOH, foi pesado calculada a porcentagem de rendimento.

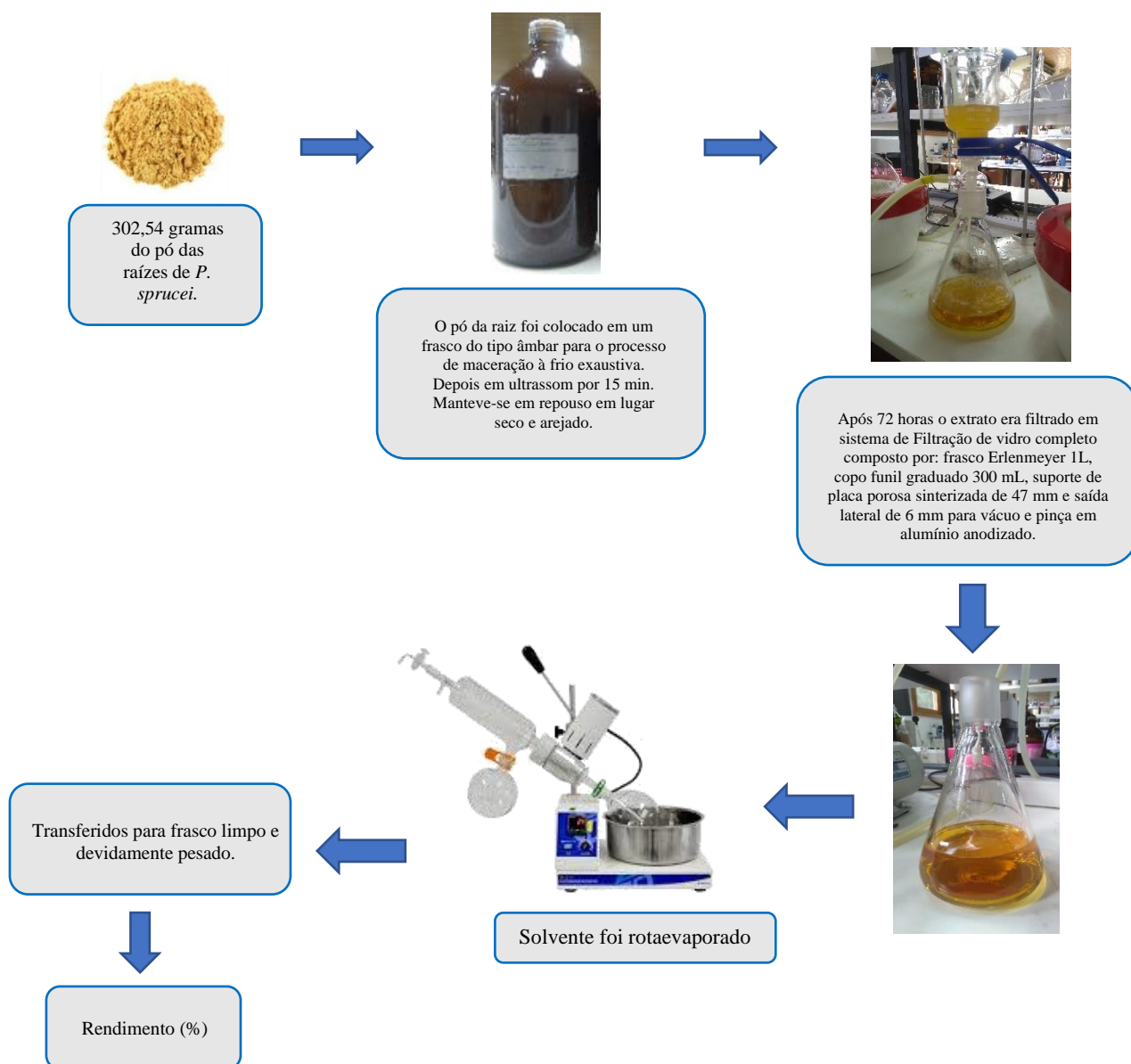


Figura 10. Fluxograma da obtenção do extrato bruto metanólico de pó de raiz de *P. sprucei* (PsMeOH)

3.4 Estudo fitoquímico

Para obter uma fração enriquecida nos constituintes de interesse (os quassinoides neosergeolida e isobruceína B), o extrato metanólico bruto seco foi submetido a fracionamento em cromatografia em coluna clássica. Os solventes usados para a fracionamento do extrato de PsMeOH (10,43 g) foram clorofórmio (CHCl_3) e metanol (MeOH) em um volume de 400 mL

do solventes nas seguintes proporções: F1 (100% CHCl₃); F2 (97:3 CHCl₃/MeOH); F3 (95:5 CHCl₃/MeOH); F3 (90:10 CHCl₃/MeOH); F5 (80:20 CHCl₃/MeOH) e F6 (100% MeOH).

3.5 Análise de frações obtidas a partir do fracionamento do extrato de PsMeOH por espectrometria de massas (MS)

As análises por espectrometria de massas do extrato de PsMeOH foram realizadas nas dependências do Centro de Apoio Multidisciplinar – Central Analítica – CAM, localizado no Setor Norte da Universidade Federal do Amazonas. Os espectros de massas foram obtidos por meio das análises em espectrômetro do tipo triplo-Quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access (Thermo scientific) equipado com fonte de ionização química à pressão ambiente (APCI).

Para as análises foram pipetados 30 µL do extrato bruto (filtrado) e transferido para *eppendorfs* e diluídos em 1000 µL de MeOH. Após esse procedimento as amostras foram injetadas no espectrômetro de massas com fonte APCI no modo positivo de aquisição em um intervalo de massa (m/z) 100-1000 Da. Os espectros obtidos foram analisados no software *Xcalibur*® 2.0.7.

3.6 Identificação e quantificação de quassinóides pelo método PULCON

Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLab) da Central Analítica (CA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Espectros de RMN unidimensionais (¹H, ¹³C e DEPT135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC) foram obtidos em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (Bruker Avance III HD, 500,13 MHz para ¹H e 125,8 MHz para ¹³C, BBFO Plus SmartProbe™). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em (Hz). O programa TopSpin 4.1 foi usado para analisar os espectros de RMN.

O qNMR da fração enriquecida com os quassinóides com base no método PULCON foi avaliado usando a ferramenta ERETIC2 (Referenciamento Eletrônico para Acesso *In Vivo* Concentrações) no software TopSpin 4.1 (Tyburn & Coutant, 2016). A sequência de pulso utilizada foi a zg90, com pontos de dados no domínio do tempo (TD) de 64 k, largura espectral (SWH) de 10 kHz, atraso de relaxação (D1) de 20,7 segundos, tempo de aquisição (AQ) de 3,27 segundos, 16 números de varredura (NS) com DS de 2, resolução de decomposição de 0,30 Hz, ganho do receptor constante em 32 com frequência de deslocamento definida para 3088, 30 Hz.

O pulso de calibração (P1 10,313 μ s) foi gerado com PLW9 de 7,183,10⁻⁵ W. O valor estimado de D1 (20,7 s) foi sete vezes o valor de T1 para o sinal quassinóide de isobruceína B (6,03 ppm). As linhas de base e as fases dos espectros de ¹H NMR das amostras foram corrigidas automaticamente usando o TopSpin 4.1.

A quantificação da fração quassinóide foi realizada em triplicata e consistiu na preparação de uma alíquota (10,1 mg) solubilizado em 550 μ L de MeOD com TMS como padrão de referência (0,0 ppm). Os comprimentos do pulso de 90° foram 10,313 μ s do sinais de neosergeolida (δ 5,75) e isobruceína (δ 6,03) e foram quantificados pelo método PULCON. A quinina padrão solução (98,0% de pureza) foi preparada (n=3) em concentrações de 13,66 mM em CD₃OD, com TMS como referência interna (0,0 ppm). Os comprimentos do pulso de 90° foram 9,976 μ s do duplete em 8,65 ppm de quinina. A constante de relaxamento longitudinal (T1) dos hidrogênios de cada um dos dois quassinóides e a quinina a ser quantificado foram determinados usando a inversão experimento de recuperação (t1r1d). As aquisições medidas de quinina foram de 17,11 s (> 7xT1).

3.7 Análise estatística

O valor dos dados quantitativos de NMR foram comparados usando o teste *T* para comparação única e ANOVA (unidirecional) com um teste de Tukey (95% de confiança) para comparação múltipla usando o programa Minitab[®] 18.1 (State College, PA, EUA), para o qual os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.8 Estudos de docking molecular dos quassinóides e alvos de SARS-CoV-2

3.8.1 Estruturas químicas

As estruturas 2D de isobruceína B e neosergeolida foram desenhadas no Chemdraw Ultra v.12.0. Os SMILES da estrutura foram obtidos por meio da interface do site <http://swissadme.ch/>. As estruturas 2D foram importadas para o Discovery Studio Visualizer v.20 para a obtenção das estruturas 3D. O mesmo procedimento foi feito para os inibidores SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp, ou seja, X77 e teaflavina, respectivamente.

3.8.2 *Predições farmacocinéticas*

As propriedades farmacocinéticas e as classificações *druglikeness* dos quassinoides foram realizadas usando SwissADME (DAINA et al, 2017). As previsões os seguintes parâmetros: Regra de Lipinski de cinco (peso molecular - MW; acceptor de ligação de hidrogênio - HBA; doador de ligação de hidrogênio - HBD; e coeficiente de partição octanol/água - LogP) e vários outros parâmetros/propriedades como área de superfície polar molecular (TPSA), logaritmo de solubilidade (LogS), absorção gastrointestinal (GI) e permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Os mesmos cálculos foram feitos com X77 e teaflavina.

3.8.3 *Predições de toxicidade*

A avaliação toxicológica dos compostos foi realizada com as plataformas pKCSM (PIRES et al., 2015), AdmetSAR (CHENG et al., 2012), Pred-hERG (BRAGA et al., 2015) e Pred-Skin (BRAGA et al., 2017) ferramentas computacionais baseadas no SMILES da estrutura. Para tal, foram considerados vários parâmetros toxicológicos, nomeadamente toxicidade de Ames, carcinogenicidade, inibição de hERG, sensibilização cutânea e hepatotoxicidade. Os resultados foram expressos como "-" para não detectado ou "+" para risco detectado. O mesmo os cálculos foram realizados com X77 e teaflavina.

3.8.4 *Preparação dos ligantes*

As estruturas 3D obtidas para os compostos foram submetidas à otimização geométrica pelo campo de força tipo Dreiding (HAHN, 1995) no Discovery Studio Visualizer v.20, e os resultados foram salvos no formato Protein Data Bank (.pdb).

3.8.5 *Preparação das proteínas*

As estruturas cristalinas 3D do SARS-CoV-2 3CLpro (PDB: 6W63) e RdRp (PDB: 6M71) foram obtidas do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) (<http://www.rcsb.org>) no formato .pdb. As estruturas foram preparadas usando as ferramentas do Discovery Studio Visualizer v.20. Moléculas de água e artefatos de cristalização foram removidos, hidrogênios polares e cargas de Kollman foram adicionados, e os hidrogênios não polares foram mesclados e os resultados foram salvos em .pdb. PyMOL v.2.3.4. foi então usado para visualizar os resultados do docking.

3.8.6 Cálculos de docking molecular

Simulações de docking molecular dos compostos com estruturas SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp foram realizadas usando o programa DockThor (<https://www.dockthor.incc.br/v2/>) (GUEDES, et. al., 2021). Na Tabela 1 estão as coordenadas e dimensões utilizadas para a enzima 3CLpro. Na Tabela 2 estão as coordenadas utilizadas para a enzima RdRp.

Tabela 1. Coordenadas e dimensões dos gridboxes para a enzima 3CLpro (PDB ID:6W63)

3CLpro (PDB ID: 6W63)	X	Y	Z
Coordenadas	-20,810	19,141	29,186
Dimensões	24	24	24

Próprio Autor.

Tabela 2. Coordenadas e dimensões dos gridboxes para a enzima RdRp (PDB ID:6M71)

RdPp (PDB ID: 6M71)	X	Y	Z
Coordenadas	117,382	111,853	121,073
Dimensões	24	24	24

Próprio Autor.

As conformações energeticamente mais favoráveis foram selecionadas para a análise. As opções avançadas foram mantido como padrão. O protocolo de docking foi validado por reencaixe do ligante X77 complexado com a estrutura 3CLpro. A validação foi considerada bem-sucedida se as 10 orientações reencaixadas mais bem classificadas mostrassem valores de RMSD de átomos pesados $\leq 2,0$ quando comparado com a orientação cristalográfica. Devido à falta de modelos com ligantes para RdRp no RCSB PDB, apenas o 3CLpro foi testado para re-docking.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a secagem completa do extrato de PsMeOH, seu peso foi de 10,4g com rendimento de 3,4% para a massa de material vegetal (302,54g). A análise espectrométrica (Figura 11) das frações obtidas da coluna de fracionamento do extrato revelou íons referentes aos quassinóides isobruceína B em m/z 481 ($[M+H]^+$) e neosergeolida em m/z 505 ($[M+H]^+$) apenas nas frações F2 e F3. Saraiva (2001) e Amorim (2009) isolaram os mesmos quassinóides conhecidos da raiz de *P. sprucei* para a espécie em estudo. A Figura 12 apresenta o espectro de fragmentação (MS/MS) da isobruceína B, e a Figura 13 mostra o espectro de fragmentação (MS/MS) da neosergeolida, o que corrobora os resultados descritos por Pohlit (2009). Ao apresentar os perfis em espectros de massa semelhantes, as frações F2 e F3 foram agrupadas, resultando em um peso de 0,7696 g.

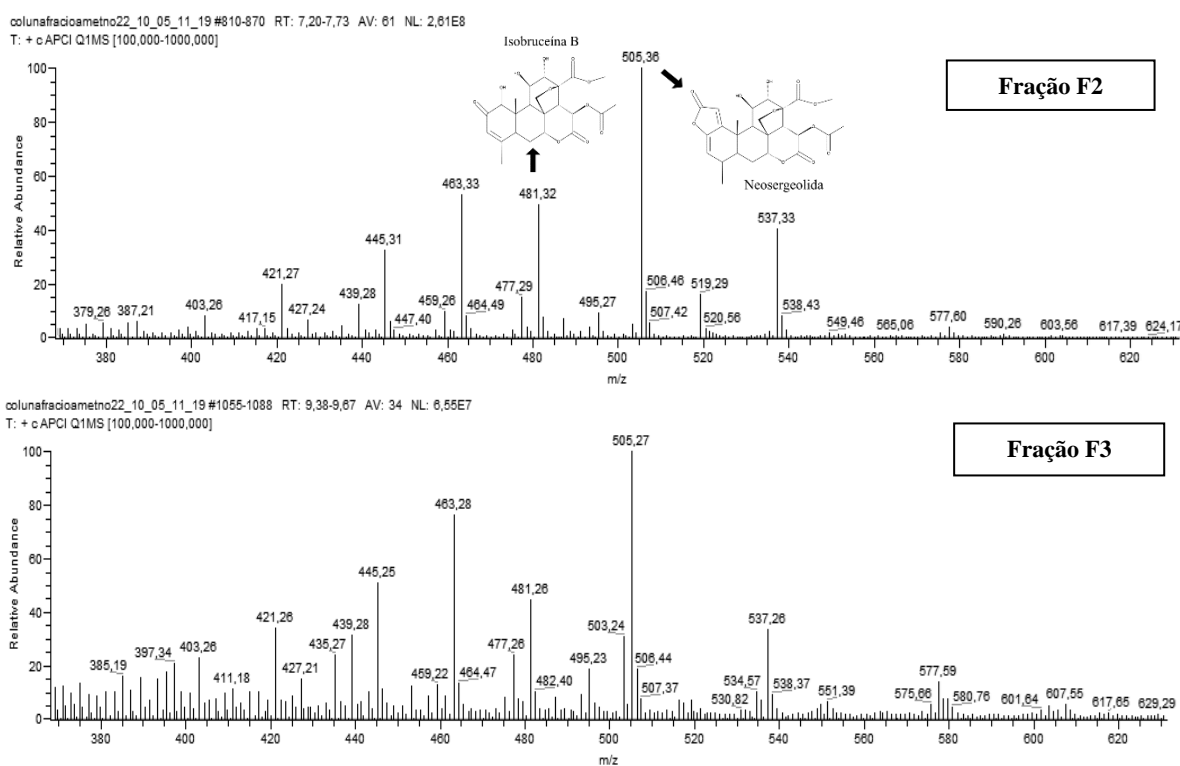


Figura 11. Espectros de massa das frações F2 e F3 da coluna de fracionamento do extrato de PsMeOH
Próprio Autor.

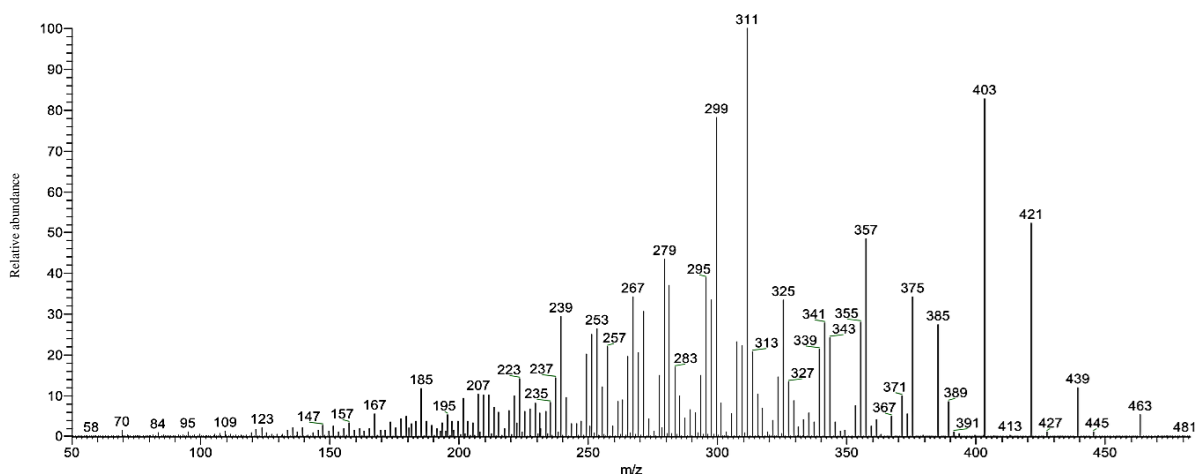


Figura 12. Espectro MS/MS do íon m/z 481 ($[M+H]^+$), isobruceína B, presente nas frações F2 e F3
Próprio Autor.

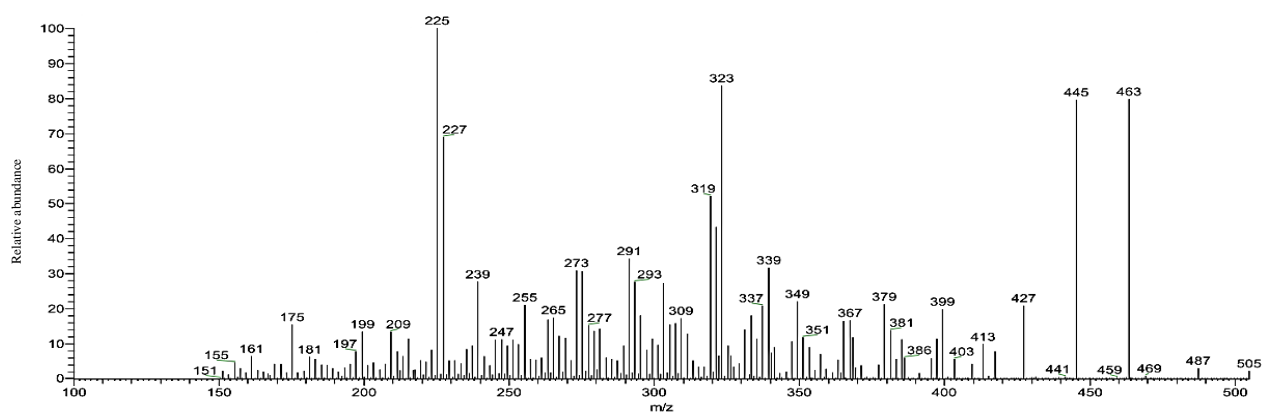


Figura 13. Espectro MS/MS do íon m/z 505 ($[M+H]^+$), neosergeolida, presente nas frações F2 e F3
Próprio Autor

O método PULCON correlaciona intensidades absolutas de dois espectros diferentes e usando o princípio da reciprocidade, o que indica que os comprimentos de pulso são inversamente proporcionais à intensidade do sinal de RMN, e a concentração do analito é determinada (BURTON et al, 2005). Os dados quantitativos obtidos pelo PULCON da fração F2-F3 (769,6 mg) com os quassinóides isobruceína B - neosergeolida (Figura 14) possibilitou a análise da proporção dos quassinóides neosergeolida (δ 5,75) e isobruceína B (δ 6,03), e foi possível observar a razão de 55,9:44,1, respectivamente. Uma concentração relativa foi usada em função de um composto conhecido para determinar a massa de cada quassinóide na massa total. A Tabela 3 mostra a massa de cada quassinóide considerando a massa total da fração F2-F3.

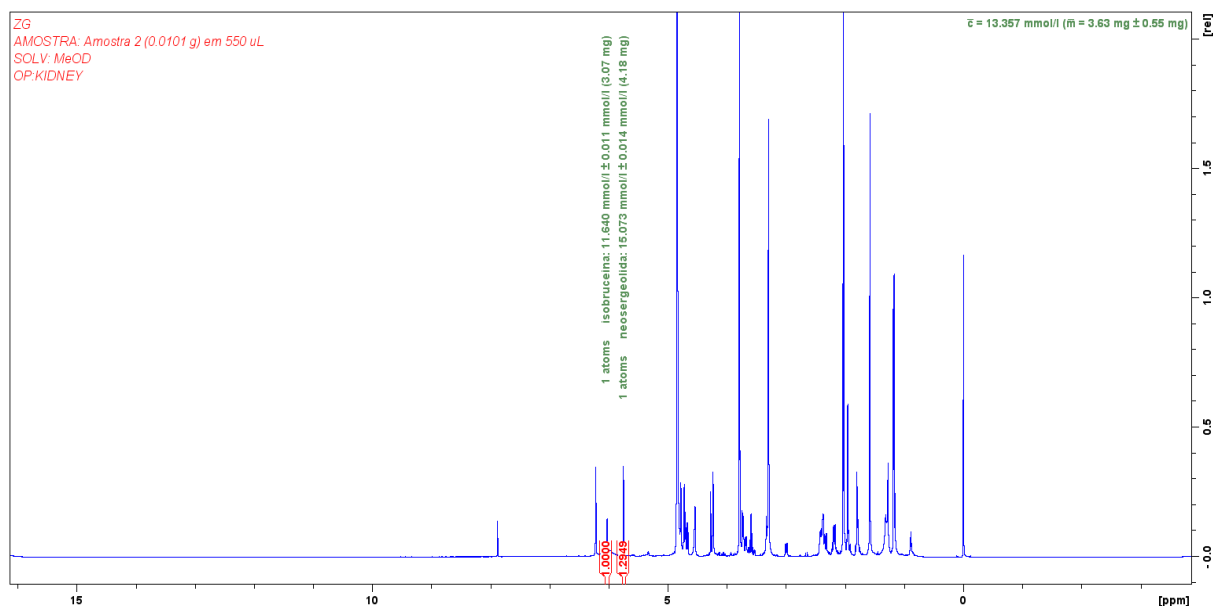


Figura 14. Espectro quantitativo de ^1H NMR da réplica 1 da mistura de isobruceína B - neosergeolida. A quantificação por qRMN foi realizada para os sinais δ 5,75 (neosergeolida) e δ 6,03 (isobruceína) Próprio Autor.

Tabela 3. Massa de cada um dos quassinóides presentes na fração F2-F3 e no extrato PsMeOH

Compostos	Conc. (mg/mL)	Conc. (mM)	Fração F2-F3 (%)	Extrato PsMeOH (%)
Neosergeolida	7.59±0.15 ^a	15.06±0.81 ^a	41.35±0.84 ^b	3.05±0.06 ^a
Isobruceína B	6.01±0.41 ^b	12.51±0.84 ^b	32.71±2.23 ^a	2.41±0.16 ^b
Outros Compostos	4.76±0.49 ^c	-	25.94±2.69 ^c	1.91±0.20 ^c

Valores com a mesma letra na mesma coluna não são significativamente diferentes ($p < 0.05$). Próprio Autor.

A análise quantitativa de quassinoides em chás utilizando raízes de *P. sprucei* realizada por Nunomura et.al. (2012) apresentaram resultados diferentes dos apresentados neste trabalho, pois os resultados desse trabalho apresentaram maior concentração de isobruceína B do que neosergeolida. No entanto, deve-se considerar que, como a isobruceína B é mais polar que a neosergeolida, possivelmente é melhor extraída usando água como solvente. A quantificação mostrou os quassinóides como os compostos mais representativos presentes no extrato de PsMeOH das raízes de *P. sprucei*, uma vez que a porcentagem dos dois quassinoides somam 5,46% da massa total (10,4 g) do extrato de PsMeOH.

Considerando que os quassinoides presentes na espécie são potencialmente ativos para diversas atividades biológicas, uma estudo desses compostos contra as proteínas do SARS-CoV-2 foi realizado. No entanto, ser altamente bioativo não é um critério suficiente para qualificar o composto como um bom candidato a fármaco (GUAN ET AL., 2019). Um melhor

perfil farmacocinético é extremamente importante para um novo composto examinado no processo de descoberta de compostos semelhantes a drogas. Por isso, é imprescindível avaliar o perfil ADMET de novos compostos primeiro para evitar um possível desperdício de tempo/recursos na busca de novos fármacos (SHOU, 2020).

Os resultados da análise ADMET revelaram as propriedades físico-químicas dos quassinoides e dos inibidores das enzimas 3Clpro e RdRp da SARS-CoV-2, conforme representado na Tabela 4. De acordo com a análise a maioria dos compostos seguiu as regras causando não mais do que uma violação. Ou seja, o PM, HBA, HBD e LogP estão dentro do aceitável. No entanto, os quassinoides foram previstos como tendo baixa absorção GI e, portanto, não são bons no sentido de biodisponibilidade oral e isso pode ser devido ao seu caráter polar (Log S e TPSA calculados). Apenas X77 apresentou alta absorção GI. Por outro lado, nenhum dos compostos foi previsto ter permeabilidade na BHE. No geral, os quassinoides e os inibidores da SARS-CoV-2 possuem um bom perfil farmacocinético.

Tabela 4. Parâmetros ADME calculados dos quassinóides e inibidores SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp

Parâmetros Farmacocinéticos	Isobruceína B	Neosergeolida	Teaflavina	X77
PM (g/mol)	480.46	504.48	564.49	459.58
HBA	11	11	12	4
HBD	3	2	9	2
Log P	-0.34	0.81	1.31	3.88
Druglikeness (Lipinski)	Sim (1 violação)	Não (2 violações)	Não (3 violações)	Sim (0 violação)
Log S	-0.77	-1.36	-4.22	-7.74
TPSA (Å ²)	165.89	154.89	217.60	90.98
Absorção GI	Baixa	Baixa	Baixa	Alta
Permeabilidade BHE	Não	Não	Não	Não

Legenda: PM= Peso molecular; HBA = acceptor de ligação de hidrogênio; HBD = doador de ligação de hidrogênio; Log P = coeficiente de partição octanol/água; Log S = logaritmo de solubilidade; TPSA = área de superfície polar molecular; GI= Absorção gastrointestinal; BHE= barreira hematoencefálica. Próprio Autor.

A análise toxicofórica dos compostos foi realizada com ferramentas capazes de identificar os principais subestruturas químicas relacionadas aos dados de toxicidade, orientando assim a procura de inibidores com baixo potencial tóxico (WHU & WANG, 2018). Essa estratégia pode ajudar a minimizar falhas comuns de toxicidade nos estágios iniciais da descoberta de medicamentos (RIM, 2020).

O resultado da análise de toxicidade dos quassinoides e dos inibidores das enzimas 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2 está representado na Tabela 5. Os dados de previsão não revelaram riscos de carcinogenicidade. Em contraste, um risco previsto de sensibilização da pele foi atribuído aos compostos, o que é um efeito adverso potencial para produtos aplicados por via dérmica (KLEINSTREUER et al., 2018). A indução da sensibilização cutânea pode provocar dermatite de contato por exposição tópica ou mesmo quando os compostos são administrados por via oral e posteriormente secretados por glândulas para a pele (YOSHIZAWA; YUKI; TSUBURA, 2016).

Apenas a neosergeolida e o inibidor X77 não apresentaram inibição do canal hERG, cuja inibição pode levar a arritmia ventricular potencialmente fatal pelo prolongamento do intervalo QT (PRIEST et al., 2008). Por outro lado, um risco detectado de toxicidade de Ames e hepatotoxicidade foi previsto para X77. O teste de Ames é um teste reverso bacteriano de curto prazo para previsão de mutagenicidade (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Em geral, podemos observar que os quassinoides possuem menor potencial toxicológico do que os inibidores de SARS-CoV-2.

Tabela 5. Cálculo dos parâmetros de toxicidade dos quassinoides e inibidores de SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp

Parâmetros de toxicidade	Isobruceína B	Neosergeolida	Teaflavina	X77
Mutagenicidade ^{1,2}	-	-	-	+
Carcinogenicidade ²	-	-	-	-
Inibição da hERG ³	+	-	+	-
Sensibilização cutânea ⁴	+	+	+	+
Hepatotoxicidade ¹	-	-	-	+

¹pKCSM ²AdmetSAR ³Pred-hERG ⁴Pred-Skin. Próprio Autor.

A análise de docking molecular foi realizada para verificar a conformação dos quassinoides dentro dos alvos SARS-CoV-2 e as afinidades de ligação. Primeiro, o procedimento de re-docking com o ligante X77 co-cristalizado no sítio de ligação SARS-CoV-2 3CLpro revelou que todas as 10 orientações mais bem classificadas apresentaram RMSD de átomos pesados < 2 quando comparadas com as orientações cristalográficas conforme (Figura 15). O protocolo de docking foi capaz de reproduzir a conformação e o modo de ligação do X77, validando as simulações de docking molecular.

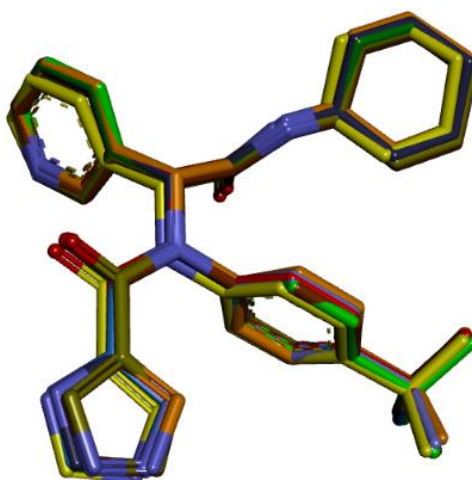


Figura 15. Análise de redocking. Sobreposição da estrutura cristalográfica do inibidor X77 (átomos de carbono em amarelo) e as dez orientações mais pontuadas obtidas por docking. Próprio Autor.

As simulações de docking entre os quassinoides e a enzima 3CLpro revelaram que eles se ligam ao sítio de ligação do receptor principalmente por ligação de hidrogênio (HB) e interações de Van der Waals (Figura 17 e 18). Os compostos apresentaram interações com os resíduos do receptor, tais como os observados no modo de ligação do inibidor (Figura 16 e Tabela 6) e, portanto, são capazes de interagir com a díade catalítica (His41 e Cys145) do receptor (QAMAR et al., 2020).

A 3CLpro cataliticamente ativa é um dímero. A clivagem por 3CLpro ocorre no resíduo de glutamina do substrato via protease Cys-145 e His-41 díade na qual o tiol de cisteína funciona como o nucleófilo no processo proteolítico (ANAND et al., 2003). As afinidades de ligação previstas mostraram que, embora X77 tenha apresentado maior afinidade, os quassinoides apresentaram valores ligeiramente inferiores em relação ao X77 (Tabela 6).

Tabela 6. Predição de afinidade de ligação, energias intermoleculares e interações com os resíduos de aminoácidos da isobruceína B, neosergeolida e re-docking do inibidor X77 com o sítio de ligação do SARS-CoV-2 3CLpro

Ligantes	Afinidade (kcal/mol)	Energia de Van der Waals (kcal/mol)	Energia Eletrostática (kcal/mol)	Interações com resíduos de aminoácidos
Isobruceína B	-8.024	-23.019	-5.398	His-41, Asn-142, Cys-145 e Glu-166
Neosergeolida	-8.248	-23.116	-8.630	Glu-166, Ser-144, Cys-145, Gln-189
X77	-9.558	-38.182	-7.684	His-41, Met-49, Leu-141, Gly-143, Cys-145, Glu-166

Próprio Autor.

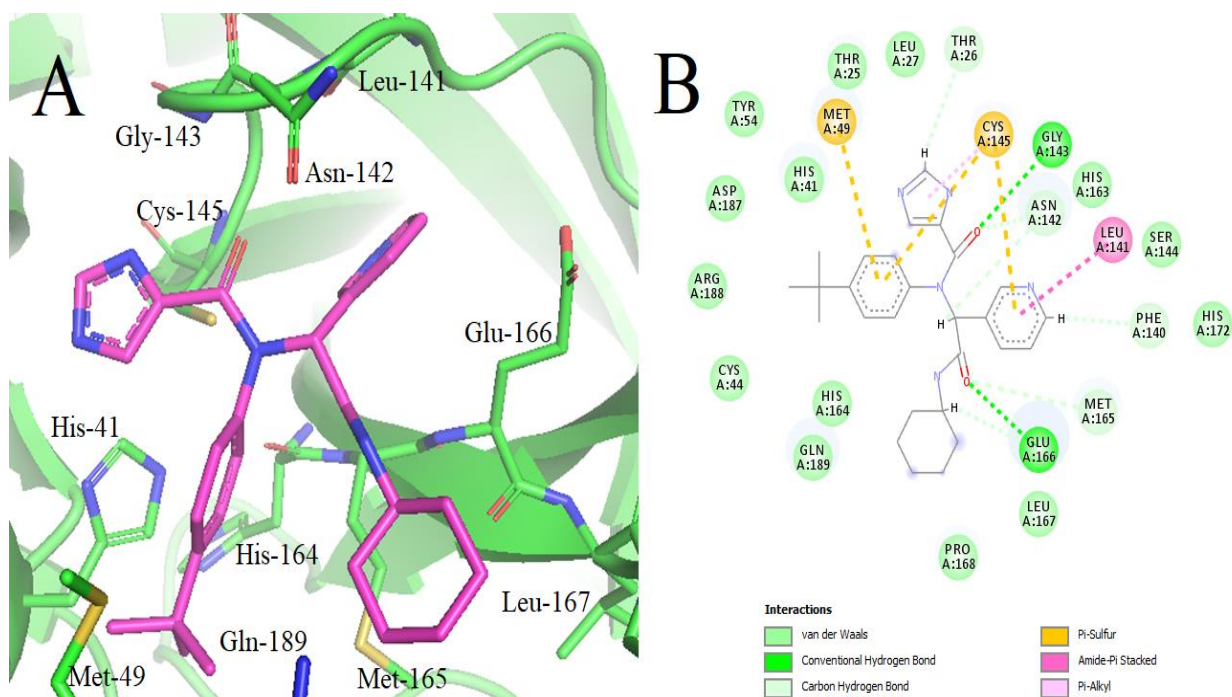


Figura 16. (A) docking molecular em 3D do X77 (átomos de carbono em vermelho) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 3CLpro, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação 2D entre o X77 e os resíduos do receptor. Próprio Autor.

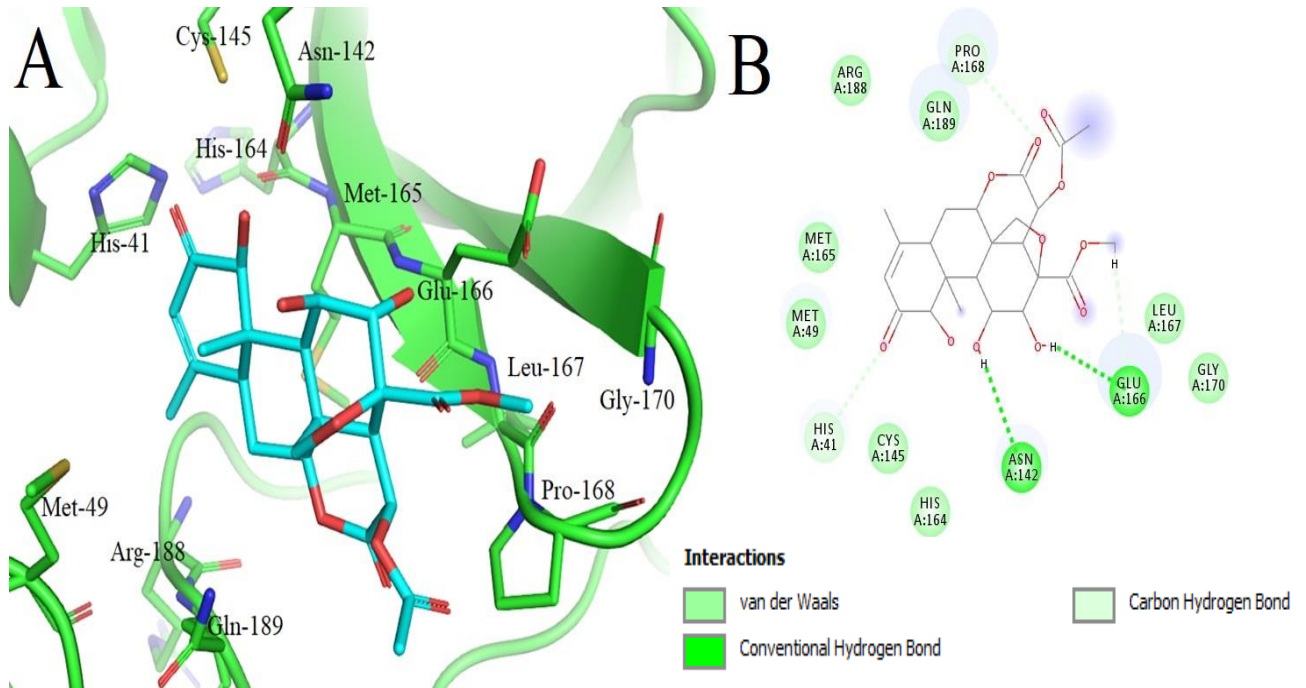


Figura 17. (A) docking molecular em 3D da isobruceína B (átomos de carbono em ciano) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 3CLpro, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da isobruceína B e os resíduos do receptor. Próprio Autor.

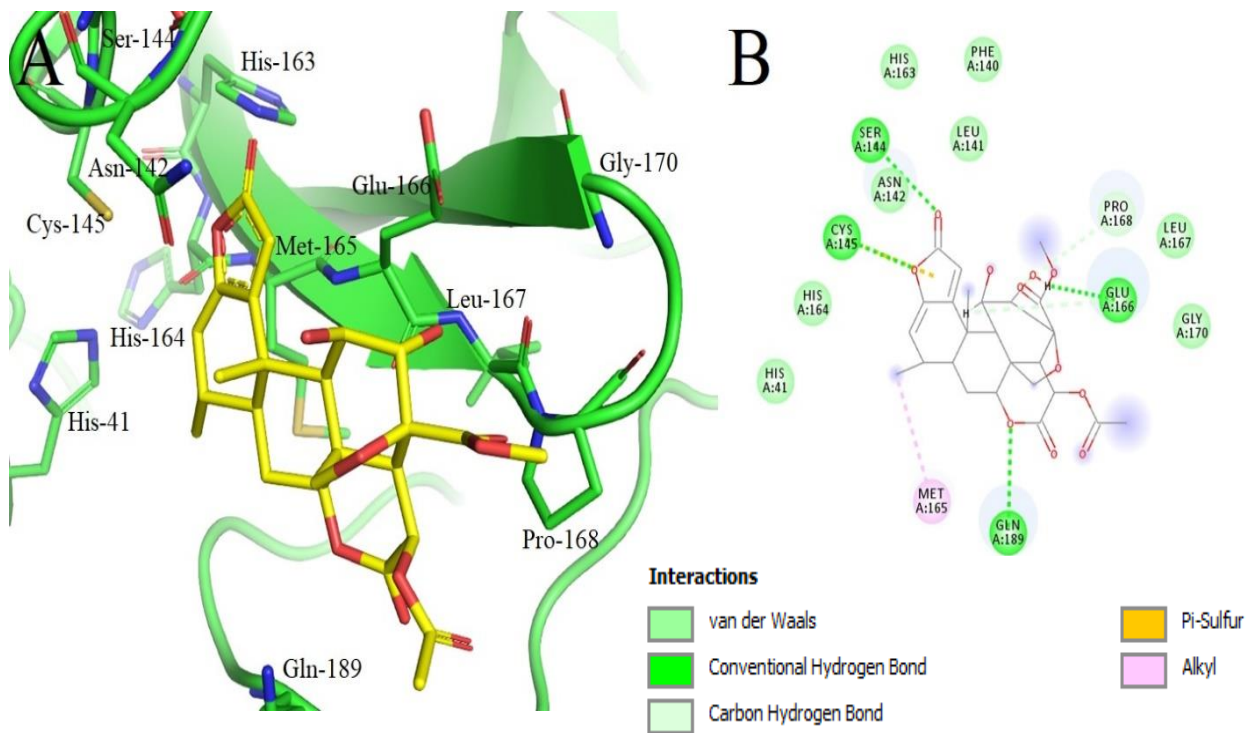


Figura 18. (A) docking molecular em 3D da neosergeolida (átomos de carbono em amarelo) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 3CLpro, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da neosergeolida e os resíduos do receptor. Próprio Autor.

As simulações de docking com o alvo RdRp da SARS-CoV-2 revelaram que os quassinoides podem se ligar aos trifosfatos de nucleosídeos (NTP) do sítio de ligação. Este sítio ativo inclui o motif A (resíduos 611-626), com o clássico resíduo de ligação catiônica bivalente 618, e motif C (resíduos 753-767), com os resíduos catalíticos 759-761 (GAO et al., 2020). Os compostos isobruceína B, neosergeolida e teaflavina realizaram interações com esses resíduos-chave principalmente por interações de ligação de hidrogênio, Van der Waals e Pi (Figura 19-21). A ligação através do túnel de RNA potencialmente bloqueia o acesso de NTPs ao sítio ativo de um lado e de RNA do outro. Sem NTPs, a replicação do RNA não pode ocorrer, bloqueando assim a replicação viral (POKHREL et al 2020). As afinidades de ligação dos compostos com o receptor foram semelhantes quando comparadas aos valores obtidos para o inibidor teaflavina (Tabela 7).

Tabela 7. Predição de afinidade de ligação, energias intermoleculares e interações com os resíduos de aminoácidos da isobruceína B, neosergeolida e do inibidor teaflavina com o sítio de ligação do SARS-CoV-2 RdRp

Ligantes	Afinidade (kcal/mol)	Energia de Van der Waals (kcal/mol)	Energia Eletrostática (kcal/mol)	Interações com resíduos de aminoácidos
Isobruceína B	-7.500	-11.971	-26.312	Lys-551, Asp-618, Lys-798, Trp-800 e Glu-811
Neosergeolida	-7.388	-21.629	-17.490	Arg-553, Asp-618, Tyr-619, Lys-621, Asp-761,
Teaflavina	-7.671	-8.245	-52.988	Arg-553, Asp-618, Asp-623, Asp-760, Asp-761 e Lys-798

Próprio Autor.

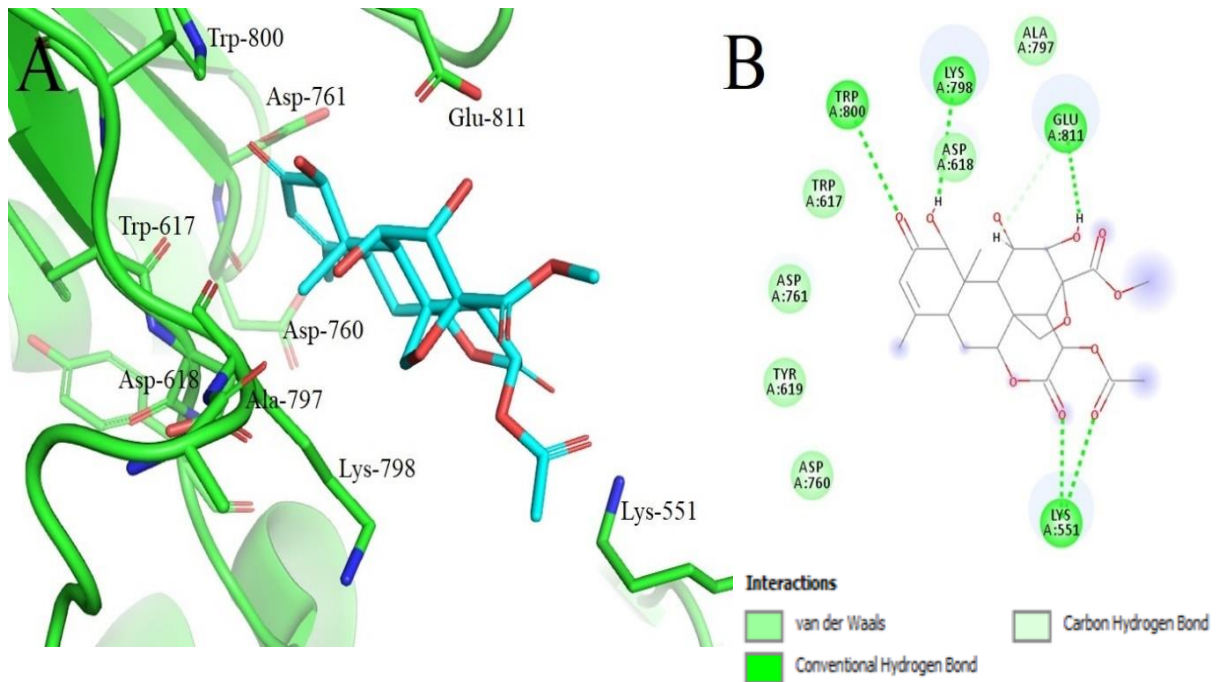


Figura 19. A) docking molecular 3D da isobruceína B (átomos de carbono em ciano) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da isobruceína B e os resíduos do receptor. Próprio Autor.

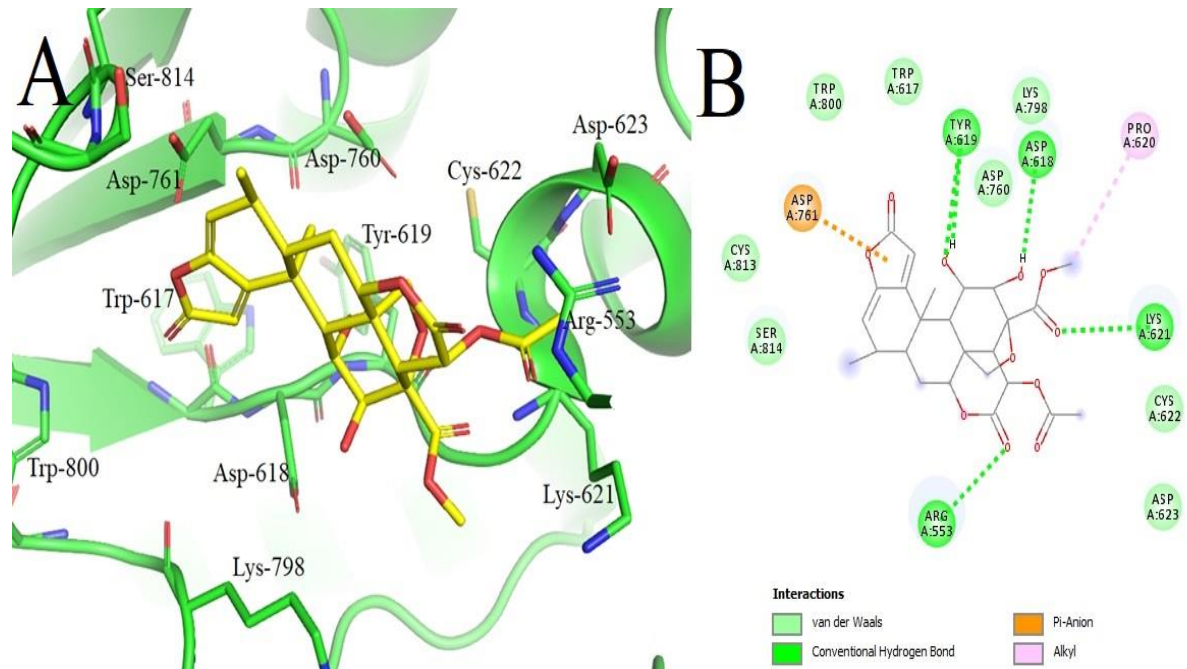


Figura 20. (A) docking molecular em 3D da neosergeolida (átomos de carbono em amarelo) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 RdRp, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da neosergeolida e os resíduos do receptor. Próprio Autor.

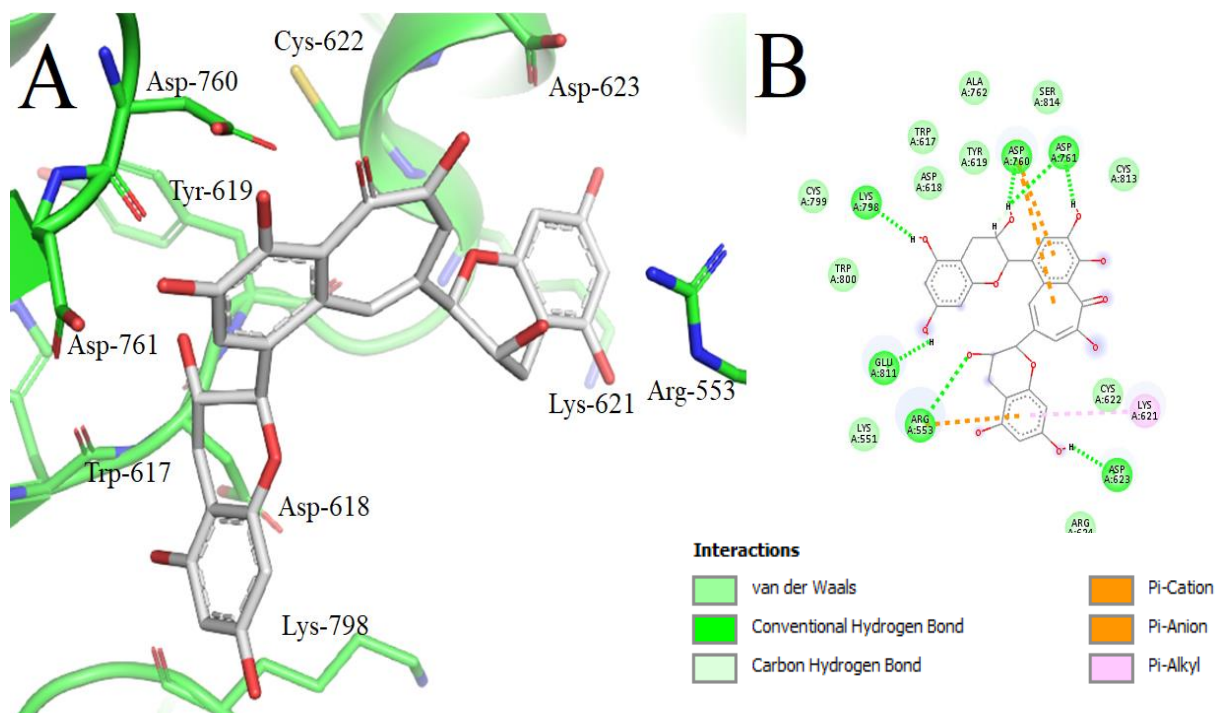


Figura 21. (A) docking molecular em 3D da teaflavina (átomos de carbono em cinza) dentro do sítio de ligação da SARS-CoV-2 RdRp, destacando as principais interações intermoleculares com resíduos. (B) Diagrama de interação da teaflavina e os resíduos do receptor. Próprio Autor.

O docking molecular, incluindo vários outros experimentos *in silico*, tornou-se uma ferramenta essencial para o planejamento e desenvolvimento de medicamentos para várias doenças. Uma série de avaliações comparativas de programas de docagem realizados nos últimos anos indicaram que os programas, assim como o método de docking molecular, podem gerar formas de ligação semelhantes às já determinadas experimentalmente e que já foram publicadas na literatura (ZAHEER-UL-HAQ et al., 2010).

Os resultados das simulações de docking molecular neste trabalho mostraram a capacidade dos quassinoides de interagir com os principais resíduos de aminoácidos em alvos da SARS-CoV-2, revelando o potencial da isobruceína B e neosergeolida como possíveis inibidores das proteínas 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2.

Hasan e colaboradores (2020) realizaram um estudo de docking molecular com a proteína 3CLpro do SARS-CoV-2 com 12 javanicinas, que são quassinoides encontrados nas espécies *Picrasma javanica* da família Simaroubaceae. O quassinóide Javanicina G mostrou a maior afinidade para SARS-CoV-2 3CLpro com uma energia de ligação de -8,2 kcal/mol. Esse resultado encontrado por esses autores corrobora o resultado encontrado para neosergeolida e proteína 3CLpro, na qual neosergeolida também apresentou afinidade de -8,248 kcal/mol.

Em outro estudo Hasan e colaboradores (2020) relataram a interação de 7 javanicólídeos, quassinoides encontrados em *Brucea javanica* com 3CLpro. Javanicolide B apresentou maior afinidade para 3CLpro com energia de ligação de -7,9 kcal/mol.

Peele e colaboradores (2020) avaliaram alguns compostos antimaláricos de origem natural para a enzima 3CLpro SARS-CoV-2. No estudo, os antimaláricos quinina, primaquina, atovaquona, artesunato e proguanil apresentaram valores de afinidade de ligação -6,508 kcal/mol, -6,361 kcal/mol, -5,493 kcal/mol, -4,862 kcal/mol e -4,842 kcal/mol, respectivamente. Esses valores sugerem que esses antimaláricos possuem uma menor afinidade por pelo sítio de ligação da enzima 3CLpro ao contrário dos quassinoides isobruceína B e neosergeolida que mostraram uma maior afinidade pelo sítio com valores de afinidade de ligação de -8,024kcal/mol e -8,248 kcal/mol para este alvo.

Guedes e colaboradores (2021) avaliaram o reposicionamento de medicamentos usando os alvos 3CLpro e RdRp. Esses fármacos já são usados na prática clínica e foram analisados contra os alvos mencionados acima. Alguns desses fármacos apresentaram um valor de afinidade de ligação para 3CLpro e RdRp inferior aos dos quassinoides estudados neste trabalho, tendo em vista que quanto mais negativo (e mais distante de zero) o valor de ΔG° , mais afinidade o ligante tem para o alvo. Alguns medicamentos antimaláricos, como cloroquina, hidroxicloroquina e mefloquina, tiveram valores de -8,06 kcal/mol, -7,83 kcal/mol e -7,46 kcal/mol, respectivamente para o alvo 3CLpro. Em contraste, a neosergeolida apresentou uma maior afinidade com um valor de -8,248 kcal/mol para o mesmo alvo. A isobruceína B teve afinidade maior que os valores mostrados pela hidroxicloroquina e mefloquina, e um valor próximo ao valor da cloroquina com um valor de afinidade de ligação de -8,024 kcal/mol.

Quanto ao alvo RdRp no mesmo estudo de Guedes e colaboradores (2021), os valores de afinidade de ligação para os fármacos cloroquina, hidroxicloroquina e mefloquina foram -7,49 kcal/mol, -7,42 kcal/mol e -7,03 kcal/mol, respectivamente. A isobruceína B apresentou um valor de afinidade de ligação de -7.500 kcal/mol, ligeiramente superior aos da cloroquina e da hidroxicloroquina, e uma afinidade de ligação mais alta para o alvo RdRp do que a mefloquina. Para este alvo, a neosergeolida teve afinidade um pouco inferior ao da cloroquina e hidroxicloroquina e superior ao valor da mefloquina (-7,388 kcal/mol).

4. CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de qRMN, que até agora não havia sido utilizada para os quassinoides da espécie *P. sprucei*, foi possível quantificá-los na fração F2-F3. Foi possível observar por meio da quantificação por qRMN que o quassinóide neosergeolida estava presente em maior quantidade em relação a isobruceína B.

Os resultados *in silico* sugerem que os quassinóides isobruceína B e neosergeolida são pontos de partida interessantes para a obtenção de novos inibidores de SARS-CoV-2 com potencial terapêutico no tratamento de COVID-19.

Este é o primeiro estudo de quassinoides de *P. sprucei* (por docking molecular) a proteínas-chave do SARS-CoV-2 que desempenham um papel importante na inibição da replicação do vírus. Assim, esses dois quassinoides podem desempenhar um papel essencial como inibidores de SARS-CoV-2 3CLpro e RdRp. Análises *in vitro* e *in vivo* são necessárias para corroborar os resultados de docking relatados e a correta otimização dessas substâncias.

O conhecimento obtido neste estudo pode ser essencial para explorar e desenvolver novos candidatos a agentes terapêuticos naturais contra a COVID-19. Além disso, também é fundamental que investigue-se os riscos de *P. sprucei* como fitomedicamento para uso contra COVID-19.

5. REFERÊNCIAS

- ANAND, K., ZIEBUHR, J., WADHWANI, P., MESTERS, J. R.; HILGENFELD, R. Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. **Science**, v. 300, p. 1763–1767, 2003.
- ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA L. F. R.; COSTA, M. R. F. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n.3 p. 359–366, 2007.
- ARRAIGA, A. M. C. et al. Chemical constituents of Simarouba versicolor. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 74, n. 3, p. 415-424, 2002.
- BAJORATH, J. J. Computational chemistry in pharmaceutical research: at the crossroads. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, p. 11-12, 2012.
- BAKHTYARI, N.G.; RAITANO G.; BENFENATI, E.; MARTIN, T.; YOUNG, D. Comparison of In Silico Models for Prediction of Mutagenicity. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v. 31, n. 1, p. 45-66, 2013.
- BRAGA, R.C.; ALVES, V.M.; SILVA, M.F.B.; MURATOV, E.; FOURCHES, D.; LIAO, L.M.; TROPSHA, A.; ANDRADE, C.H. **Pred-hERG: A novel web-accessible computational tool for predicting cardiac toxicity.** *Mol. Inf.* v. 34, p. 698-701, 2015.
- BRAGA, R. C.; ALVES, V. M.; MURATOV, E. N.; STRICKLAND, J.; KLEINSTREUER, N.; TROPSHA, A.; ANDRADE, C. H. J. **Pred-Skin: A Fast and Reliable Web Application to Assess Skin Sensitization Effect of Chemicals.** *Chem. Inf. Model.* v. 57, n. 5, p. 1013–1017, 2017.
- BURTON, I. W., QUILLIAM, M. A. & WALTER, J. A. Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. **Analytical Chemistry**, 77, 3123– 3131, 2005.
- CHENG, F.; LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P. W.; TANG, Y.; 2012. admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. **J. Chem. Inf. Model**, v. 52, p. 3099–3105.
- CORNELL, J. A.; **Experiments with Mixture: designs, models, and the analysis of mixture data**; 3a ed., John Wiley & Sons Ltd, NY, 2002.
- DAINA, A; MICHELIN, O; ZOETE, Z. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.** v. 7, p. 42717, 2017.
- DAS, S., SARMAH, S., LYNDEM, S.; ROY, A. S. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 1-11, 2020.
- Da Silva, F. M. A., da Silva, K. P. A., de Oliveira, L. P. M., Costa, E. V., Koolen, H. H. F., Pinheiro, M. L. B., de Souza, A. Q. L. & de Souza, A. D. L. (2020). Flavonoid glycosides and

their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 115, p. 1–8.

DISCOVERY STUDIO, version 3.1, Accelrys Software Inc., San Diego, CA, 2011.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. USA: CRC, 1994. p. 137.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961.

GAO, Y., YAN, L., HUANG, Y., LIU, F., ZHAO, Y., CAO, L., WANG, T., SUN, Q., MING, Z., ZHANG, L., GE, J., ZHENG, L., ZHANG, Y., WANG, H., ZHU, Y., ZHU, C., HU, T., HUA, T., ZHANG, B., YANG, X., LI, J., YANG, H., LIU, Z., XU, W., GUDDAT, L. W., WANG, Q., LOU, Z.; RAO, Z. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. **Science**, v. 368, n. 6492, 779-782, 2020.

GHAHREMANPOUR, M. M., TIRADO-RIVES, J., DESHMUKH, M., IPPOLITO, J. A., ZHANG, C.H., VACA, I.C., LIOSI, M. E., ANDERSON, K. S.; JORGENSEN, W. L. Identification of 14 known drugs as inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 12, p. 2526-2533, 2020.

GLEESON, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. **J Med Chem.**, v. 51, n. 4, p. 817-34, 2008.

GUAN, L., YANG, H., CAI, Y., SUN, L., DI, P., LI, W., LIU, G. & TANG, Y. ADMET- score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. **Medchemcomm**, v. 10, n. 1, 148-157, 2018.

GUEDES, I. A., COSTA, L. S. C., SANTOS, K. B., KARL, A. L. M., ROCHA, G. K., TEIXEIRA, I. M., GALHEIGO, M. M., MEDEIROS, V., KREMPSE, E., CUSTÓDIO, F. L., BARBOSA, H. J. C., NICOLÁS, M. F.; DARDEME L. E. Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. **Scientific Reports**, 11, 5543, 2021.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M. O et al. (org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2007. p. 15-20.

GUPTA, S.; MOHAN, C. G. Dual binding site and selective acetylcholinesterase inhibitors derived from integrated pharmacophore models and sequential virtual screening. **Biomed Res Int**, v. 2014, p.21, 2014.

HAHN, M. Receptor Surface Models. 1. Definition and Construction. **Journal of Medicinal Chemistry**, 38, 12, 2080–2090, 1995.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HASAN, A., MAHAMUD R. A., BONDHON, T. A., JANNAT, K., JAHAN, R., RAHMATULLAH M. Can javanicins be potential inhibitors of SARS-CoV-2 C-3 like protease? An evaluation through molecular docking studies. **Journal of Natural & Ayurvedic Medicine**, v. 4, n. 2, 000250, 2020.

HASAN, A., MAHAMUD, R. A., BONDHON, T. A., JANNAT, K., FARZANA, B., JAHAN & RAHMATULLAH, M. Molecular docking of quassinoid compounds javanicolides A-F and H with C3-like protease (or 3CL pro) of SARS and SARS-C0V-2 (COVID-19) and VP8* domain of the outer capsid protein VP4 of rotavirus A. **Journal of Medicinal Plants Studies**. v. 8, n. 4 Part A, p. 14-19, 2020.

PEELE, K. A., POTLA, D. C., SRIHANSA, T., KRUPANIDHI, S., AYYAGARI, V. S., BABU, D. J., INDIRA, M., REDDY, A. R., VENKATESWARULU T. C. Molecular docking and dynamic simulations for antiviral compounds against SARS-CoV-2: a computational study. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 19, p. 100345, 2020.

JEFFREY, P.; SUMMERFIELD, S. Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 33-37, 2010.

JORGENSEN, W. L. The Many Roles of Computation in Drug Discovery. **Science**, v. 303, p. 1813–8, 2004.

JORGENSEN, W. L. Efficient drug lead discovery and optimization. **Acc Chem Res.**, v. 42, n. 6, p.724-33, 2009.

KASA, P.; RAKONCZAY, Z.; GULYA, K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. **Prog. Neurobiol.**, v. 52, n. 6, p. 511-535, 1997.

KLEINSTREUER, N. C., HOFFMANN, S., ALÉPÉE, N., ALLEN, D., ASHIKAGA, T., CASEY, W., CLOUET, E., CLUZEL, M., DESPREZ, B., GELLATLY, N., GÖBEL, C., KERN, P. S., KLARIC, M., KÜHN, J., MARTINOZZI-TEISSIER, S., MEWES, K., MIYAZAWA, M., STRICKLAND, J., VAN VLIET, E., ZANG, Q. & PETERSOHN D. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches *. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 48, n. 5, 359-374, 2018.

LE COINTE, P. Árvores e plantas úteis (Amazônia brasileira III). **Companhia Editora Nacional**, 92, 1947.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 3, p. 402-406, 1996.

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

LIPINSKI, C.: CHRIS LIPINSKI. Interview by Peter Kirkpatrick. **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 11, p. 900–901, 2012.

LIU, T.; LIN, Y.; WEN, X.; JORISSEN, R.N.; GILSON VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 603-609, 2003.

LONNI, A. A. S. G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, L. M. C.; TREVISAN, D. T. Differentiation of species of the Baccharis genus by HPLC and chemometric methods; **Analytical Science**, v. 19, p. 1013-1018, 2003.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. **Economic Botany**. v. 51, n. 3, p. 212-237, 1997.

MORETTI, C.; POLONSKY, J.; VUILHORGNE, M.; PRANGE, T. Isolation and structure of sergeolide, a potent cytotoxic quassinoid from *Picrolemma pseudocoffea*. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 6, p. 647-650, 1982.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, p. 489-527, 2007.

MORTELMANS, K. & ZEIGER E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 20, n. 455, p.29-60, 2000.

MORSE, J. S., LALONDE, T., XU, S. & LIU, W. R. Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. **ChemBioChem**, v. 21, n. 5, p. 730-738, 2020.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R E. Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria; ed. Campinas, Editora da UNICAMP, 2003.

NEVES, K. O. G., RAMOS, A. S., BRUGINSKI, E. R. D., DE SOUZA, A. D. L., NUNOMURA, R. C. S., CAMPOS, F. R., DA SILVA, F. M. A.; MACHADO, M. B. Lisboaeflavanonol A: A new flavonoid glycoside obtained from Amazonian Eugenia lisboae. **Phytochemistry Letters**, v. 43, p. 65-69, 2021.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, Mar 27;83(3):770-803, 2020.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C.; Chemoface: a Novel Free User-Friendly Interface for Chemometrics **J. Sci. Food Agric**, v. 92, n. 433. 2012.

NUNOMURA, R. C. S., et al. *In vitro* studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). **Acta Amazonica, Manaus**, v. 36, n. 3, p. 327-330, 2006.

NUNOMURA, R. C. S., SILVA, E. C. C., NUNOMURA, S. M., AMARAL, A. C. F., BARRETO, A. S., SIANI A. C., POHLIT, A. M. Quantification of antimalarial quassinoids neosergeolide and isobrucein b in stem and root infusions of *Picrolemma sprucei* Hook F. by HPLC-UV analysis. **Chromatography and Its Applications**, 187-200, 2012.

OKANO, M., FUKAMIYA, N., TAGAHARA, K., COSENTINO, M., LEE, T. T., NATSCHKE, S.M. E LEE, K. Anti-HIV activity of quassinoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 6, p. 701-706, 1996.

OKUNADE, A. L. et al. Antiplasmodial Activity of Extracts and Quassinoids Isolated from Seedlings of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae). **Phytotherapy Research**. v. 17, p. 675–677, 2003.

OPREA, T. I. (ed). In **Chemoinformatics in Drug Discovery**, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

OVERINGTON, J. P, AL-LAZIKANI B, HOPKINS AL. How many drug targets are there? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 12, p. 993-996, 2006.

PIRANI, J.R.; THOMAS, W.W. 2015 *Simaroubaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1307>>. Acesso em 8 nov. 2018.

PIRES, D.E.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B., 2015. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **J. Med. Chem.** v. 58, p. 4066–4072.

PLENGE R. M.; SCOLNICK, E. M.; ALTSHULER, D. Validating therapeutic targets through human genetics. **Nat Rev Drug Discov.** v. 12, n. 8, p. 581-94. 2013.

POHLIT, A. M., et al. LC-ESI-MS Determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma sprucei* stem infusions. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 20, n. 6, p. 1065-1070, 2009b.

POHLIT, A. M.; VALQUÍRIA, A. P. J.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, E. C. C.; NORBERTO P. L. LC-ESI-MS Determination of Quassinoids Isobrucein B and Neosergeolide in *Picrolemma sprucei* Stem Infusions. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 20, No. 6, 1065-1070, 2009.

POKHREL, R., CHAPAGAIN, P. & SILTBERG-LIBERLES, J. Potential RNA-dependent RNA polymerase inhibitors as prospective therapeutics against SARS-CoV-2. **Journal of Medical Microbiology**, 69(6), 864-873, 2020.

POLONSKY, J. Quassinoid Bitter Principles II. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, 47, 221-265, 1985.

QAMAR, M. T., ALQAHTANI, S. M., ALAMRI, M. A. & CHEN, L. L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n.4, p. 313-319, 2020.

PRIEST, B. T., BELL, I. M. & GARCIA, M. L. Role of hERG potassium channel assays in drug development. **Channels (AUSTIN)**, v.2, n. 2, p. 87-93, 2008.

RIBEIRO, J. E. L., et al. Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA: Manaus, 799p., 1999.

RIM, K. T. *In silico* prediction of toxicity and its applications for chemicals at work [published online ahead of print.. **Toxicol Environ Health Sci**, 1-12, 2020.

SARAIVA, R.C.G. **Estudo Fitoquímico de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae) e**

Dosagem dos Princípios Antimaláricos nos Chás do Caule e Raiz. 2001. 88p. Dissertação (Mestrado em Química) Master's Dissertation, UFAM, Manaus, 2001.

SARAIVA, R. C. G., et al. Anatomia Foliar e caulinar da *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). **Acta Amazonica**. v. 33, n. 2, p. 213-219, 2003.

SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. Frazão. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev. psiquiatr.** Rio Gd. Sul, Porto Alegre, v. 30, n. 1, supl. 2008. S

SHARMA, V.; SARKAR, I. N. Leveraging biodiversity knowledge for potential phytotherapeutic applications. **Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA**, v. 20, n. 4, p. 668–79, 2013.

SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 16, n. 432, p. 862-865, 2004.

SHOU, W. Z. Current status and future directions of high-throughput ADME screening in drug discovery. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 3, 201-208, 2020.

SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

VANDENBERG, J. I.; PERRY, M. D.; PERRIN, M. J.; MANN, S. A.; KE, Y.; HILL AP. hERG K(+) channels: structure, function, and clinical significance. **Physiol Rev**. v. 92, n. 3, p. 1393-478, 2012.

VASCONCELOS C. et al. Validação de plantas medicinais com atividade antihelmíntica. Botucatu 2005. **Revista.brasileira.plantas.medicinais.**, v.7, n. 3, p. 97-10, 2005.

VEIGA, JR. V. F.; MACIEL, M. A M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERDONK ML, COLE JC, HARTSHORN MJ, MURRAY CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**. Sep 1;52(4):609-23, 2003. doi: 10.1002/prot.10465.

VIEIRA, I.J.C.; RODRIGUES, E.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Complete ¹H and ¹³C chemical shift assignments of a new C22-quassinoid isolated from *Picrolemma sprucei* Hook by NMR spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.**, v. 38, p. 805-808, 2000.

VIGNERON, M. et al. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 98, p. 351-360, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2022). Coronavirus disease (COVID-19) situation reports. Retrieved from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Accessed 18 January 2022.

WOLBER G.; DORNHOFER A. A.; LANGER, T. Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. **J Comput Aided Mol Des**, v. 20, n. 12, p. 773-88, 2006.

WU, Y. & WANG, G., Machine Learning Based Toxicity Prediction: From Chemical Structural Description to Transcriptome Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n.8, 2358, 2018.

WU, C., LIU, Y., YANG, Y., ZHANG, P., ZHONG, W., WANG Y, WANG, Q., XU, Y., LI, M., LI, X., ZHENG, M., CHEN, L.; LI, H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 5, p. 766-88, 2020.

XU, W.; MANICKE, N. E.; COOKS, G. R.; OUYANG, Z. Miniaturization of Mass Spectrometry. **Analysis Systems**. v. 15, n. 6, p. 433-439, 2010.

XU, C.; CHENG, F.; CHEN, L.; DU, Z.; LI, W.; LIU, G.; LEE, P. W.; TANG, Y. In silico prediction of chemical Ames mutagenicity. **J Chem Inf Model.**, v. 26, n. 52, p. 2840-7, 2012.

YOSHIZAWA, K.; YUKI M.; TSUBURA, A. Drug-Induced Cutaneous Toxicity. In: Larramendy M, Soloneski S (eds) Toxicology-New aspects to this scientific conundrum. **INTECH**, Rijeka, p. 1–24.

YU, R., CHEN, L., LAN, R., SHEN, R. & LI, P. Computational screening of antagonist against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 2, p. 106012, 2020.

ZAHEER-UL-HAQ, HALIM, S. A., UDDIN, R.; MADURA, J. D. Benchmarking docking and scoring protocol for the identification of potential acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 28, n. 8, p. 870-882, 2010.

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.; CHINA NOVEL CORONAVIRUS INVESTIGATING AND RESEARCH TEAM. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England journal of medicine**, v. 382, n.8, p. 727–733, 2020.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CASTELLANO, E.E.; FHO, E.R.; VIEIRA, I.J.C. A new quassinoid isolated from *Piccolella pseudocoffea*. **Acta Crystallographica C**, v. 50, p. 794-797, 1994.

APÊNDICE

qNMR quantification and *in silico* analysis of isobrucein B and neosergeolide from *Picrolemma sprucei* as potential inhibitors of SARS-CoV-2 protease (3CLpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and pharmacokinetic and toxicological properties

Quantificação por qRMN e análise *in silico* de isobruceína B e neosergeolida de *Picrolemma sprucei* como potenciais inibidores de protease SARS-CoV-2 (3CLpro) e RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e propriedades farmacocinéticas e toxicológicas

Cuantificación por qNMR y análisis *in silico* de isobruceína B y neosergeolida de *Picrolemma sprucei* como inhibidores potenciales de la proteasa del SARS-CoV-2 (3CLpro) y la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y propiedades farmacocinéticas y toxicológicas

Received: 11/12/2021 | Reviewed: 11/20/2021 | Accept: 11/25/2021 | Published: 12/07/2021

Marcos Túlio da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7653-4944>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: marcostulio39@gmail.com

Matheus Gabriel de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0692-9729>
Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil
E-mail: matheusgabriel06@hotmail.com

José Realino de Paula

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4424-7692>
Universidade Federal de Goiás, Brasil
E-mail: pjrpaula@gmail.com

Vinicius Barreto da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5066-7431>
Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Brasil
E-mail: viniciusbarreto.farmacia@gmail.com

Kidney de Oliveira Gomes Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5238-4243>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: kidneydeoliveira@gmail.com

Marcos Batista Machado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8791-4803>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: marcosmachado@ufam.edu.br

Rita de Cássia Saraiva Nunomura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1119-7238>
Universidade Federal do Amazonas, Brasil
E-mail: ritasnunomura@gmail.com

Abstract

Objective: To quantify the quassinoids of *P. sprucei*, a medicinal plant that is native to the Amazon region, using qNMR and investigate the inhibitory potential of isobrucein B and neosergeolide on the 3CLpro and RdRp targets of SARS-CoV-2 through *in silico* approaches. **Methods:** the quantification was performed in a fraction (F2-F3) enriched with the quassinoids isobrucein B and neosergeolide using the PULCON method. *In silico* assays were performed using molecular docking to assess interactions and binding affinity between neosergeolide and isobrucein B ligands with SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp targets, and online servers were used to estimate pharmacokinetic and toxicity. **Results:** It was possible to determine the quantity of the two quassinoids isobrucein B and neosergeolide in the F2-F3 fraction (769.6 mg), which were present in significant amounts in the PsMeOH extract (5.46%). The results of the docking analysis, based on the crystallized structures of RdRp and 3CLpro, indicated that isobrucein B and neosergeolide are potential inhibitors of the two proteins evaluated, as well as showing the importance of hydrogen bonding and pi (π) interactions for the active sites foreseen for each target. **Conclusion:** The results suggest that *P. sprucei* quassinoids may

interact with 3CLpro and RdRp targets. *In vitro* and *in vivo* experiments are needed to confirm the results of molecular docking and investigate the risks of using *P. sprucei* as a medicinal plant against COVID-19.

Keywords: Quassinoids; Caferana; Molecular Docking; qNMR; SARS-CoV-2.

Resumo

Objetivo: Quantificar os quassinóides de *P. sprucei*, uma planta medicinal nativa da região amazônica, usando qRMN e investigar, o potencial inibitório da isobruceína B e neosergeolida nos alvos 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2 por meio de abordagens *in silico*. **Métodos:** a quantificação foi realizada em uma fração (F2-F3) enriquecida com os quassinóides isobruceína B e neosergeolida pelo método PULCON. Os ensaios *in silico* foram realizados por meio de docking molecular para avaliar a interações e afinidade de ligação entre os ligantes neosergeolida e isobruceína B com os alvos 3CLpro e RdRp da SARS-CoV-2 e servidores online foram utilizados para estimar os parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade. **Resultados:** foi possível determinar a quantidade em mg dos dois quassinóides isobruceína B e neosergeolida na fração F2-F3 (769.6 mg), presentes em quantidades significativas no extrato PsMeOH (5,46%). Os resultados da análise de docking, com base nas estruturas cristalizadas de RdRp e 3CLpro, indicou isobruceína B e neosergeolida indicou que isobruceína B e neosergeolida são inibidores potenciais das duas proteínas avaliadas, bem como mostrou a importância da ligação de hidrogênio e interações pi (π) para os sítios ativos previstos para cada alvo. **Conclusão:** Os resultados sugerem que os quassinóides de *P. sprucei* podem interagir com os alvos 3CLpro e RdRp. Experimentos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar os resultados de docking molecular e investigar os riscos de *P. sprucei* como planta medicinal contra a COVID-19.

Palavras-chave: Quassinoides; Caferana; Docking molecular; qRMN; SARS-CoV-2.

Resumen

Objetivo: Cuantificar los cuassinoides de *P. sprucei*, una planta medicinal nativa de la región Amazónica, mediante qNMR e investigar a través de enfoques *in silico*, el potencial inhibitorio de isobruceína B y neosergeolida sobre objetivos 3CLpro y RdRp del SARS-CoV-2. **Métodos:** la cuantificación se realizó en una fracción (F2-F3) enriquecida con los cuassinoides isobruceína B y neosergeolida, utilizando qRMN por el método PULCON. Se realizaron ensayos *in silico* utilizando acoplamiento molecular para evaluar las interacciones y la afinidad de unión entre los ligantes de neosergeolida e isobruceína B con objetivos de SARS-CoV-2 3CLpro y RdRp, además se utilizaron servidores en línea para estimar la farmacocinética y la toxicidad. **Resultados:** se pudo determinar la cantidad en mg de los dos cuassinoides isobruceína B y neosergeolida en la fracción F2-F3 (769,6 mg), presentes en cantidades significativas en el extracto de PsMeOH (5,46%). Los resultados del análisis de acoplamiento molecular, basados en las estructuras cristalizadas de RdRp y 3CLpro, indicaron que isobruceína B y neosergeolida son inhibidores potenciales de las dos proteínas evaluadas, además de mostrar la importancia de los enlaces de hidrógeno y las interacciones pi (π) para los sitios activos previstos para cada objetivo. **Conclusión:** Los resultados sugieren que los cuassinoides de *P. sprucei* pueden interactuar con los objetivos 3CLpro y RdRp. Se necesitan más investigaciones y experimentos *in vitro* e *in vivo* para confirmar los resultados del acoplamiento molecular e investigar los riesgos de *P. sprucei* como planta medicinal contra COVID-19.

Palabras clave: Cuassinoides; Caferana; qRMN; Acoplamiento molecular; SARS-CoV-2.

1. Introduction

The SARS-CoV-2 coronavirus pandemic emerged in Wuhan, China, with the first infections being reported in December 2019 (COVID-19). Due to its rapid spread, by June 2021, more than 178 million cases of the disease had been registered worldwide, and deaths already surpass three million people (World Health Organization [WHO], 2021). Representing an unprecedented challenge, extensive research into developing new antiviral drugs for COVID-19 has identified potential targets that play an important role in blocking viral infection (Ghahremanpour et al., 2020).

Chinese research groups have sequenced the SARS-CoV-2 genome and its non-structural proteins (NSP), including the spike protein, 3-chymotrypsin-like cysteine protease (3CLpro), also called the major protease (Mpro), papain-like protease (PLpro), and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Zhu et al., 2019; Morse et al., 2020). The protein's role is to bind the virus to the human receptor – a metallopeptidase called angiotensin-2 converting enzyme (ACE2), while 3CLpro and PLpro provide components to pack new virions of large translated viral polyproteins into the host ribosome, and finally, RdRp replicates the SARS-CoV-2 RNA genome (Morse et al., 2020).

The 3CLpro and RdRp targets have great importance in the viral replication of SARS-CoV-2 and stand out as essential targets in computational strategies such as molecular docking (Qamar et al., 2020; Wu et al., 2020; Das et al., 2020; Yu et al., 2020). Molecular docking is currently being used as a powerful tool in addition to being rational and low-cost for screening new

antiviral agents against COVID-19 and allows us to understand how these NSPs are important targets of SARS-Cov-2 and how they will interact with ligands at the active site (Qamar et al., 2020; Wu et al., 2020; Das et al., 2020; Yu et al., 2020; Rahmatullah et al., 2020).

Regarding ligands, drugs used against other human diseases and natural products present in medicinal plants, such as flavonoids, and other bioactive compounds, such as quassinoids, have been used as candidates in virtual screening approaches. (Da Silva et al., 2020; Neves et al., 2021). In addition, the quassinoids are potential candidates in virtual screening approaches in the search for new agents against COVID-19 (Hasan et al., 2020; Qamar et al., 2020; Rahmatullah et al., 2020). Because they do not have easy access to medicines, a large part of the world population, including indigenous tribes, *quilombolas*, and riverine communities in the Amazon, resort to the use of medicinal plants, which in most cases are the only source of medicine for the treatment or cure of diseases (Le Cointe, 1947; Da Silva et al., 2020;)

Picrolemma sprucei Hook, from the Simaroubaceae family, is a native plant of the Amazon region that is popularly used as a medicinal plant, mainly for the treatment of malaria (Nunomura, 2006; Pohlit et al., 2009b; Ribeiro et al., 1999). It is popularly known in Brazil as “caferana” due to its similarity to *Coffea arabica* L. It can be found in street markets and through herbalists in the region and is marketed as an antimalarial and for the treatment of fevers, in the Adolpho Lisboa Municipal Market in Manaus (Cavalcante, 1983; Thomas 1990; Ribeiro et al., 1999; Ferreira, 2000; Saraiva et al., 2002).

The main constituents of *P. sprucei* are the quassinoids, which are only produced by species of this family. Quassinoids are biodegraded triterpenes and are highly oxygenated with a wide range of biological activities. Many quassinoids exhibit a wide range of biological activities *in vitro* and/or *in vivo*, including antiviral, antitumor, antimalarial, anti-inflammatory, antifeedant, insecticidal, amoebicidal, antiulcer, and herbicidal activities (Guo et al., 2005).

Previous research on the roots and stems of *P. sprucei* resulted in the isolation of the main quassinoids of this species, neosergeolide and isobrucein B (Moretti et al., 1982; Zukerman-schpecto & Castellano, 1994, Vieira et al., 2000, Saraiva, 2001, Amorim, 2009). Nunomura et al. (2006) demonstrated *in vitro* anthelmintic activity of isobrucein B and neosergeolide isolated from the chloroform fraction of *P. sprucei* against *Haemonchus contortus*. This nematode parasitizes the gastrointestinal system of sheep and other animals. Other *in vitro* studies report antitumor, antimalarial, anthelmintic, cytotoxic, insecticidal, and anti-leishmanial activities of neosergeolide and isobrucein B (Fukamiya, et. al., 2005; Almeida et al., 2007; Andrade-Neto, et al., 2007; Silva et al., 2009b).

Therefore, the present study quantified the quassinoids neosergeolide and isobrucein B of *P. sprucei* using NMR and the PULse Length-based CONcentration determination methodology (PULCON). qNMR has shown to be a less laborious and high precision alternative in the simultaneous quantification of organic compounds in a complex mixture (Oliveira et al., 2021). In addition, the study carried out the tracking analysis of these quassinoids using molecular docking, in order to test them as potential inhibitors of SARS-CoV- 23CLpro and RdRp and is the first work to report this analysis of neosergeolide and isobrucein B against COVID-19 target enzymes.

2. Methodology

2.1 Plant material

Plant material was collected in February 2018 in the Adolpho Ducke Forest Reserve in the city of Manaus, Brazil under geographic coordinates (02° 54' 48.2" S, 59° 58' 49.2" W) after obtaining authorization from the Biodiversity Authorization and Information System (SISBIO No. 46383). The botanical identification of the species as *Picrolemma sprucei* Hook.f. was carried out at the National Institute for Amazonian Research (INPA) by Mariana Rabello Mesquita. The exsiccate of the plant in the INPA herbarium is identified as 279918. Access to genetic heritage was registered (AE76F92) in the National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen).

2.2 Plant material processing

The plant material was dried in a forced air circulation oven at 40 °C until completely dry. After drying, the material was separated into roots, stems, leaves, and fruits. Then, the part of the plant of interest in this work, the roots, was chopped into lengths of about 10 cm using pruning scissors and a hatchet, followed by fine grinding in a knife mill to obtain a fine powder (302.54 g).

2.3 Preparation of the plant extract

The *P. sprucei* root powder (302.54 g) was subjected to cold maceration (2 weeks) with hexane (1.0 L) with the aid of ultrasound to remove non-polar substances. This material was later extracted with methanol (1.0 L) via cold maceration. The methanol extract of *P. sprucei* root powder (PsMeOH) was obtained by exhaustive cold maceration (3 weeks). The PsMeOH was concentrated in a rotary evaporator (Fisatom® 801) at a temperature of 40 °C to remove all the solvent. After the complete drying of the PsMeOH extract, it was weighed to calculate the percentage of yield.

2.4 Phytochemical study

To obtain a fraction that was enriched in the constituents of interest (the quassinoids neosergeolide and isobrucein B), the dry crude methanolic extract was subjected to fractionation in classical column chromatography. The solvents used for the fractionation of the PsMeOH extract (10.43 g) were chloroform (CHCl₃) and methanol (MeOH) in a volume of 400 mL of the solvents in the following proportions: F1 (100% CHCl₃); F2 (97:3 CHCl₃/MeOH); F3 (95:5 CHCl₃/MeOH); F4 (90:10 CHCl₃/MeOH); F5 (80:20 CHCl₃/MeOH) and F6 (100% MeOH).

2.5 Analysis of fractions obtained from fractionation of PsMeOH extract by mass spectrometry (MS)

The spectrometry analyses of the fractions obtained from the fractionation of the PsMeOH extract were carried out at the Multidisciplinary Support Center – Analytical Center – CAM, located at the Federal University of Amazonas. The mass spectra were obtained by analysis in a triple-quadrupole spectrometer, (model TSQ Quantum Access Thermo scientific), equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) chamber. For the analysis, 30 µL of each fraction was pipetted (filtered) and transferred to Eppendorf tubes and diluted in 1000 µL MeOH; this procedure was performed for the six samples. After this procedure, the samples were injected into the mass spectrometer with the APCI source in positive acquisition mode in a mass range (m/z) of 100-1000 Da. The obtained spectra were analyzed using *Xcalibur*® 2.0.7 software.

2.6 Identification and quantification of quassinoids via the PULCON method

The nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were carried out at the Nuclear Magnetic Resonance Laboratory (NMRLab) of the Analytical Center (CA) of the Federal University of Amazonas (UFAM). One-dimensional (¹H, ¹³C, and DEPT135) and two-dimensional (COSY, HSQC, and HMBC) NMR spectra were obtained in a nuclear magnetic resonance spectrometer (Bruker Avance III HD, 500.13 MHz for ¹H and 125.8 MHz for ¹³C, BBFO Plus SmartProbe™). Chemical shifts were expressed in ppm (δ) and coupling constants (J) were recorded in (Hz). The TopSpin 4.1 program was used to manipulate the NMR spectra.

The qNMR of the quassinoid fraction based on the PULCON method was evaluated using the ERETIC2 (Electronic Referencing to Access In Vivo Concentrations) tool in TopSpin 4.1 software (Tyburn & Coutant, 2016). The pulse sequence

used was the zg90, with time-domain data points (TD) of 64 k, spectral width (SWH) of 10 kHz, relaxation delay (D1) of 20.7 seconds, acquisition time (AQ) of 3.27 seconds, 16 scan numbers (NS) with DS of 2, decomposition resolution of 0.30 Hz, receiver gain constant at 32 with offset frequency set to 3088, 30 Hz. The calibration pulse (P1 10.313 μ s) was generated with PLW9 of 7.183.10⁻⁵ W. The estimated value of D1 (20.7 s) was seven times the value of T1 for the isobrucein B quassinoid signal (6.03 ppm). Baselines and phases of the samples' ¹H NMR spectra were automatically corrected using TopSpin 4.1.

The quantification of the quassinoid fraction was performed in triplicate and consisted of preparing an aliquot (10.1 mg) solubilized in 550 μ L of MeOD with TMS as a reference standard (0.0 ppm). The lengths of the 90° pulse were 10.313 μ s of the signals of neosergeolide (δ 5.75) and isobrucein (δ 6.03) and were quantified using the PULCON method. The standard quinine solution (98.0% purity) was prepared (n=3) in concentrations of 13.66 mM in CD₃OD, with TMS as an internal reference (0.0 ppm). The lengths of the 90° pulse were 9.976 μ s of the doublet in 8.65 ppm of quinine. The longitudinal relaxation constant (T1) of the hydrogens of each of the two quassinoids and the quinine to be quantified were determined using the inversion recovery experiment (t1ir1d). The measured acquisitions of quinine were 17.11 s (> 7xT1).

2.7 Molecular docking studies of quassinoids and targets of SARS-CoV-2

2.7.1 Chemical structures

The 2D structures of isobrucein B and neosergeolide were drawn on *Chemdraw Ultra* v.12.0. The structure's SMILES were obtained using the interface of the website <http://swissadme.ch/>. The 2D structures were imported to *Discovery Studio Visualizer* v.20 for the obtention of the 3D structures. The same procedure was done for the SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp inhibitors, namely X77 and theaflavin, respectively.

2.7.2 Pharmacokinetic predictions

The pharmacokinetic properties and drug-likeness predictions of the quassinoids were performed using SwissADME (Daina et al., 2017) from the structure's SMILES. Predictions included an evaluation of the following parameters: Lipinski's rule of five (molecular weight – MW; hydrogen bond acceptor - HBA; hydrogen bond donor - HBD; and octanol/water partition coefficient - LogP) and several other parameters/properties such as molecular polar surface area (TPSA), logarithm of solubility (LogS), gastrointestinal (GI) absorption, and blood–brain barrier (BBB) permeation. The same calculations were performed with X77 and theaflavin to compare the pharmacokinetic predictions with the SARS-CoV-2 inhibitors.

2.7.3 Toxicity predictions

The compound's toxicity was predicted using the pKCSM (Pires et al., 2015), AdmetSAR (Cheng et al., 2012), Pred-hERG (Braga et al., 2015), and Pred-Skin (Braga et al., 2017) computational tools based on the structure's SMILES. For this purpose, several toxicological parameters were considered, namely Ames toxicity, carcinogenicity, hERG inhibition, skin sensitization, and hepatotoxicity. The results were expressed as "-" for non-detected or "+" for detected risk. The same calculations were performed with X77 and theaflavin.

2.7.4 Docking simulations - Ligand preparation

The 3D structures obtained for the compounds were subjected to geometry optimization by the Dreiding-like forcefield (Hahn, 1995) method in *Discovery Studio Visualizer* v.20, and the results were saved in *Protein Data Bank* (PDB) format.

2.7.5 Protein preparation

The 3D crystal structures of the SARS-CoV-2 3CLpro (PDB: 6W63) and RdRp (PDB: 6M71) were retrieved from Research Collaboratory for Structural Bioinformatics *Protein Data Bank* (RCSB PDB) (<http://www.rcsb.org>) in PDB format. These structures were prepared using *Discovery Studio Visualizer* v.20 tools. Water molecules and bound ligands were removed, polar hydrogens and Kollman charges were added, and the non-polar hydrogens were merged, and the results were saved in PDB format. *Pymol* v.2.3.4. was then used to visualize the docking results.

2.7.6 Docking calculations

Docking simulations of compounds with SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp structures were performed using the *DockThor* server. For 3CLpro, the grid box was centered at $x = -20.810$, $y = 19.141$ and $z = -29.186$, with $x = 24 \text{ \AA}$, $y = 24 \text{ \AA}$ and $z = 24 \text{ \AA}$ size. For RdRp, the grid box was centered at the $x = 117.382$, $y = 111.853$ and $z = 121.073$, with $x = 24 \text{ \AA}$, $y = 24 \text{ \AA}$ and $z = 24 \text{ \AA}$ size. The most energetically favorable conformations were selected for the analysis. The advanced options were maintained as default. The docking protocol was validated by redocking the ligand X77 complexed with the 3CLpro structure. Validation was considered successful if the 10 top-ranked redocked orientations showed heavy atom RMSD values ≤ 2.0 when compared with crystallographic orientation. Due to the lack of models with ligands for RdRp in the RCSB PDB, only the 3CLpro was tested for redocking.

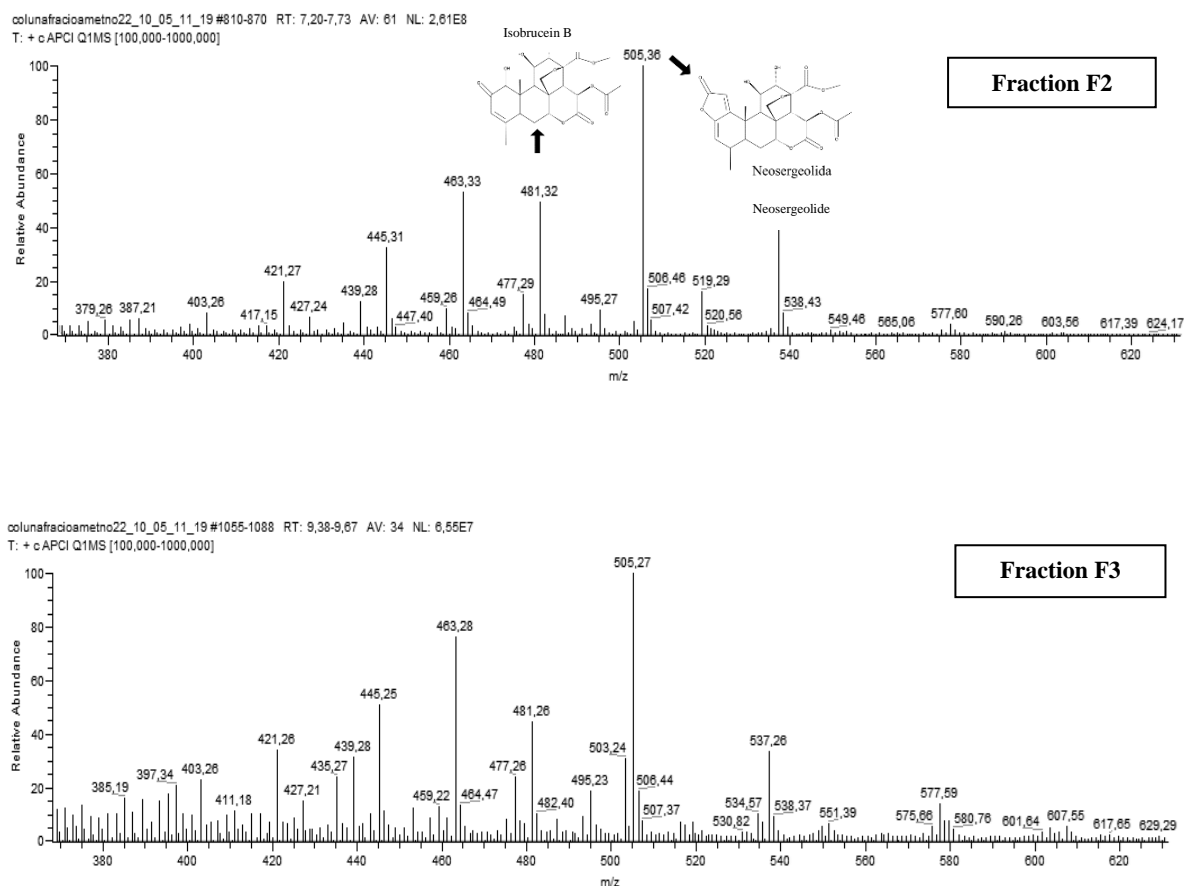
2.8 Statistical analysis

The quantitative NMR data value were compared using the T-test for single comparison and ANOVA (one-way) with a Tukey test (95 % confidence) for multiple comparison using the Minitab® 18.1 program (State College, PA, USA), for which the results were expressed as mean \pm standard deviation.

3. Results and Discussion

After the complete drying of the PsMeOH extract, its weight was 10.4g with a yield of 3.4% for the mass of plant material (302.54 g). The spectrometric analysis (Figure 1) of the fractions obtained from the extract fractionation column revealed ions referring to the quassinoids isobrucein B at m/z 481 ($[M+H]^+$) and neosergeolide at m/z 505 ($[M+H]^+$) only in fractions F2 and F3. Saraiva (2001) and Amorim (2009) isolated the same known quassinoids from the root of *P. sprucei* for the species under study. Figure 2 presents the fragmentation spectrum (MS/MS) of isobrucein B, and Figure 3 shows the fragmentation spectrum (MS/MS) of neosergeolide, which corroborates the results described by Pohlit (2009). By presenting the profiles in similar mass spectra, the F2 and F3 fractions were pooled, resulting in a weight of 0.7696 g.

Figure 1. Mass spectra of fractions F2 and F3 from the fractionation column of the PsMeOH extract.



Source: Authors (2021).

Figure 2. MS/MS spectrum of ion m/z 481 ($[M+H]^+$), isobrucein B, present in fractions F2 and F3.

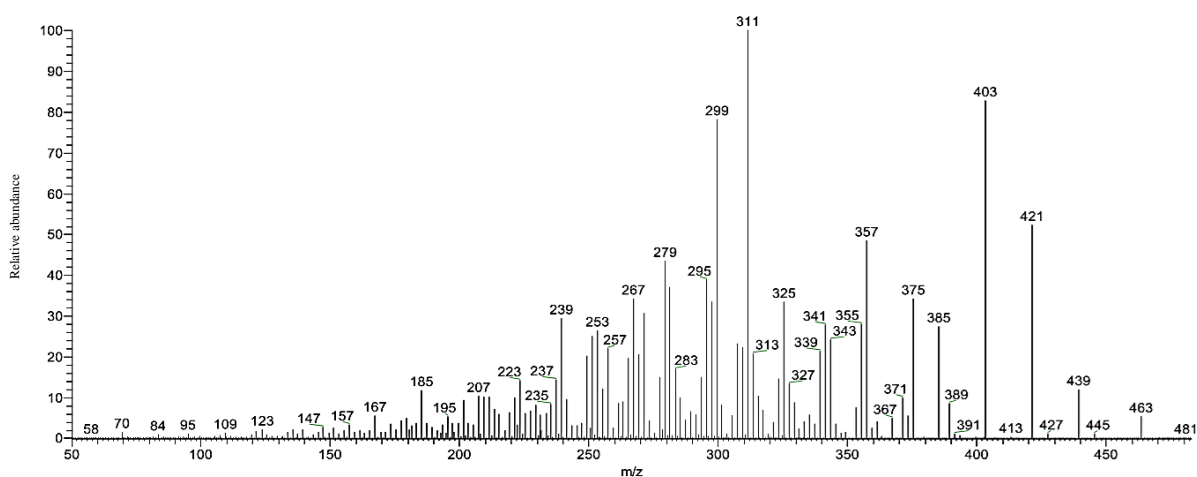
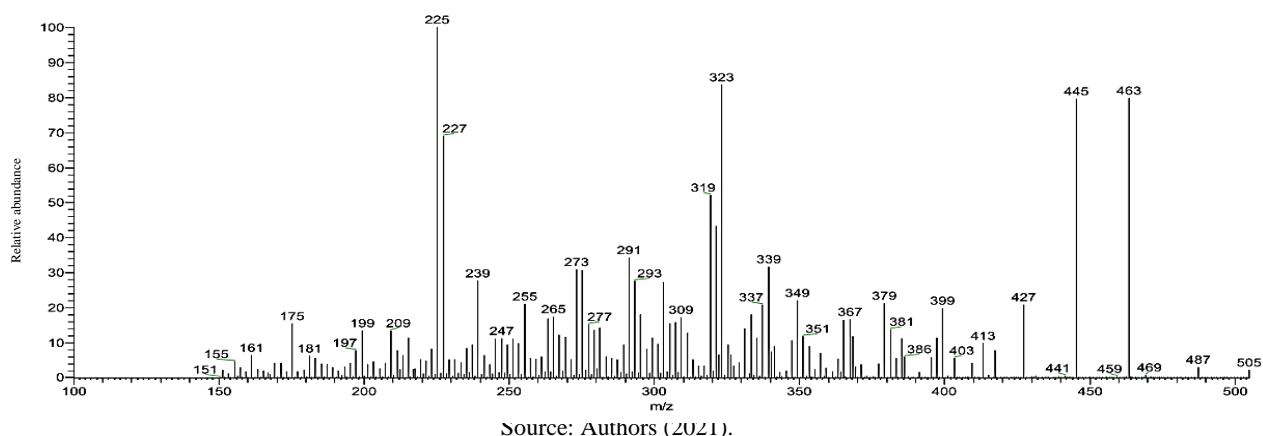


Figure 3. MS/MS spectrum of ion m/z 505 ($[M+H]^+$), neosergeolide, present in fractions F2 and F3.



The PULCON method correlates absolute intensities of two different spectra and using the principle of reciprocity, which indicates that pulse lengths are inversely proportional to the intensity of the NMR signal, and the analyte concentration is determined (Burton et al, 2005).

The quantitative data obtained by PULCON of the F2-F3 fraction (769.6 mg) with the quassinoids isobrucein B-neosergeolide (Figure 4) enabled the analysis of the proportion of the quassinoids neosergeolide (δ 5.75) and isobrucein B (δ 6.03), and it was possible to observe the ratio of 55.9:44.1, respectively. A relative concentration was used as a function of a known compound to determine the mass of each quassinoid in the total mass. Table 1 shows the mass of each quassinoid considering the total mass of the F2-F3 fraction.

Figure 4. Quantitative ^1H NMR spectrum of replica 1 of the isobrucein B-neosergeolide-mixture. Quantification by qNMR was performed for signals δ 5.75 (neosergeolide) and δ 6.03 (isobrucein).

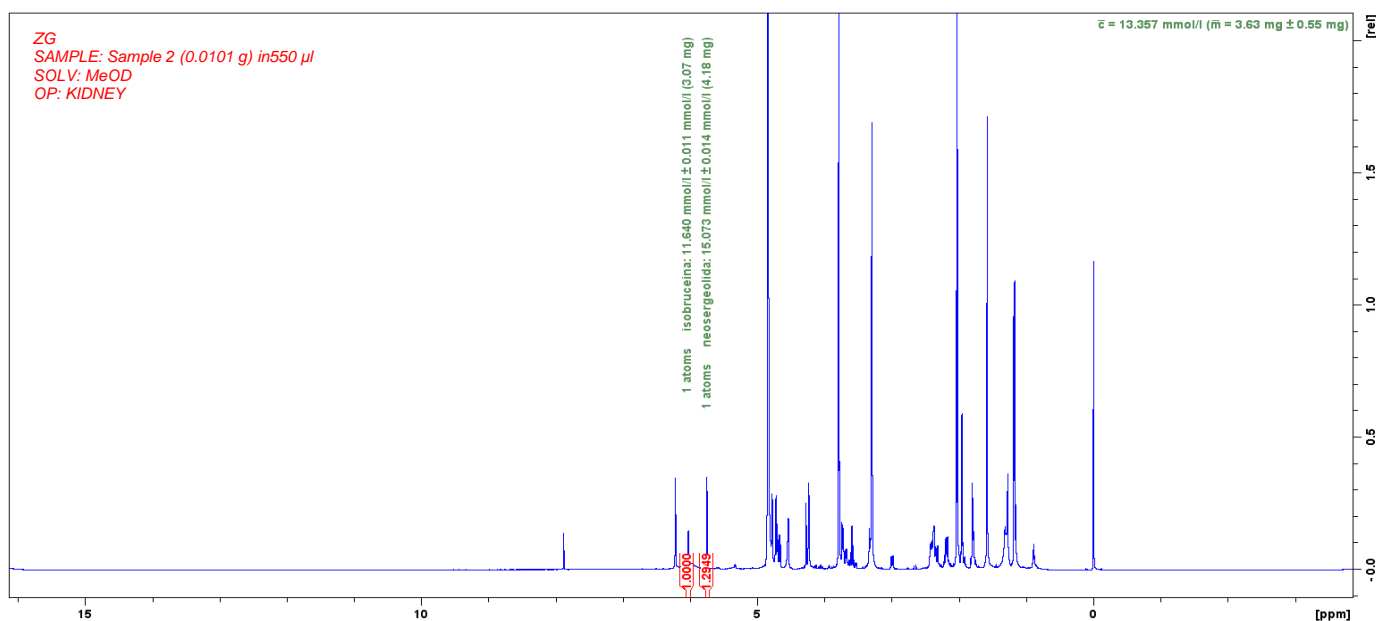


Table 1. Mass of each of the quassinoids present in the F2-F3 fraction and the PsMeOH extract.

Compounds	Conc. (mg/mL)	Conc. (mM)	Fraction F2-F3 (%)	PsMeOH extract (%)
Neosergeolide	7.59±0.15 ^a	15.06±0.81 ^a	32.71±2.23 ^a	3.05±0.06 ^a
Isobrucein B	6.01±0.41 ^b	12.51±0.84 ^b	41.35±0.84 ^b	2.41±0.16 ^b
Other compounds	4.76±0.49 ^c	-	25.94±2.69 ^c	1.91±0.20 ^c

Values with the same letter in the same column are not significantly different ($p < 0.05$). Source: Authors (2021).

The quantitative analysis of quassinoids in root-based teas carried out by Nunomura et.al. (2012) provided results different from those presented in this work since ours showed a higher concentration of isobrucein B than neosergeolide. However, it should be considered that since isobrucein B is more polar than neosergeolide, it is possibly better extracted by using water as a solvent. The quantification showed the quassinoids as the most representative compounds present in the PsMeOH extract of the *P. sprucei* roots since the percentage of the two quassinoids adds up to 5.46% of the total mass (10.4 g) of the PsMeOH extract.

Considering that the quassinoids present in the species are potentially active for several biological activities, a theoretical study of these compounds against the proteins of SARS-CoV-2 was carried out. However, being highly bioactive is not a good enough criterion to qualify the compound as a good candidate (Guan et al., 2019). A better pharmacokinetic profile is extremely important for a novel compound examined in the process of drug/drug-like compound discovery. Hence, it is imperative to evaluate the ADMET profile of new compounds earlier to avoid a possible waste of time/resources (Shou, 2020).

The ADMET analysis results revealed the physicochemical properties of the quassinoids and the SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp inhibitors, as represented in Table 2. According to Lipinski's rule of five (Lipinski et al., 2001), most of the compounds followed the rules by causing no more than one violation. That is to say, the MW, HBA, HBD, and LogP are within the acceptable range. However, the quassinoids were predicted as having low GI absorption, and thus not good in an orally bioavailable sense, and this may be due to its polar character (LogS and TPSA calculated). Only X77 was predicted as having high GI absorption. On the other hand, none of the compounds were predicted to have BBB permeation. In general, the quassinoids and the SARS-CoV-2 inhibitors possess a good pharmacokinetic profile.

Table 2. Calculated ADME parameters of the quassinoids and SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp inhibitors.

Pharmacokinetic parameters	Isobrucein B	Neosergeolide	Theaflavin	X77
MW (g/mol)	480.46	504.48	564.49	459.58
HBA	11	11	12	4
HBD	3	2	9	2
Log P	-0.34	0.81	1.31	3.88
Druglikeness (Lipinski)	Yes (1 violation)	No (2 violations)	No (3 violations)	Yes (0 violation)
Log S	-0.77	-1.36	-4.22	-7.74
TPSA (Å ²)	165.89	154.89	217.60	90.98
GI absorption	Low	Low	Low	High
BBB permeation	No	No	No	No

Key: MW = molecular weight; HBA = hydrogen bond acceptor; HBD = hydrogen bond donor; Log P = octanol/water partition coefficient; Log S = logarithm of solubility; TPSA = Topological polar surface area; GI= Gastrointestinal absorption; BBB= blood-brain barrier. Source: Authors (2021).

The toxicophorical analysis of the compounds was performed with tools that are capable of identifying the main chemical substructures related to toxicity data, thus guiding the design of inhibitors with low toxic potential (Whu & Wang, 2018). This strategy intends to minimize common toxicity failures in the early stages of drug discovery (Rim, 2020). The result of the toxicity analysis of the quassinoids and the SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp inhibitors is represented in Table 3. Prediction data revealed no risks regarding carcinogenicity. In contrast, a predicted risk of skin sensitization was attributed to the compounds, which is a potential adverse effect for dermally applied products (Kleinstreuer et al., 2018). Only Neosergeolide and X77 were predicted as non-inhibitors of the hERG channel, for which inhibition may lead to ventricular arrhythmia (Priest et al., 2008). On the other hand, a detected risk of Ames toxicity and hepatotoxicity was predicted for X77. The Ames test is a short-term bacterial reverse test for mutagenicity prediction (Mortelmans & Zeiger, 2000). In general, we can observe that the quassinoids possess lower toxicological potential than the SARS-CoV-2 inhibitors.

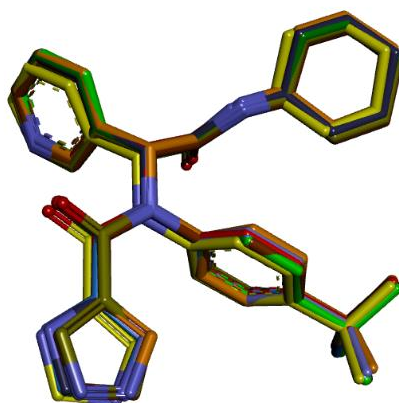
Table 3. Calculated toxicity parameters of the quassinoids and SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp inhibitors.

Toxicity parameter	Isobrucein B	Neosergeolide	Theaflavin	X77
Ames toxicity ^{1,2}	-	-	-	+
Carcinogenicity ²	-	-	-	-
hERG inhibition ³	+	-	+	-
Skin sensitization ⁴	+	+	+	+
Hepatotoxicity ¹	-	-	-	+

¹pKCSM ²AdmetSAR ³Pred-hERG ⁴Pred-Skin. Source: Authors (2021).

Molecular docking analysis were performed to verify the conformation of the quassinoids within SARS-CoV-2 targets and the binding affinities. First, the redocking procedure with the ligand X77 complexed in SARS-CoV-2 3CLpro binding site revealed that all the 10-top ranked orientations presented heavy atoms RMSD < 2 when compared with the crystallographic conformation (Figure 5). The docking protocol was able to reproduce the conformation and the binding mode of X77, thus validating our docking simulations.

Figure 5. Superimposition of the crystallographic structure of X77 (carbon atoms in yellow) and the ten top-scored orientations obtained by docking.



Source: Authors (2021).

Docking simulations between the compounds and SARS-CoV-2 3CLpro revealed that they bind at the receptor-binding pocket mainly by hydrogen bond (HB) and Van der Waals interactions (Figure 7 and 8). The compounds presented interactions with the receptor residues such as those observed in the inhibitor's binding mode (Figure 6 and Table 4) and are thus capable of

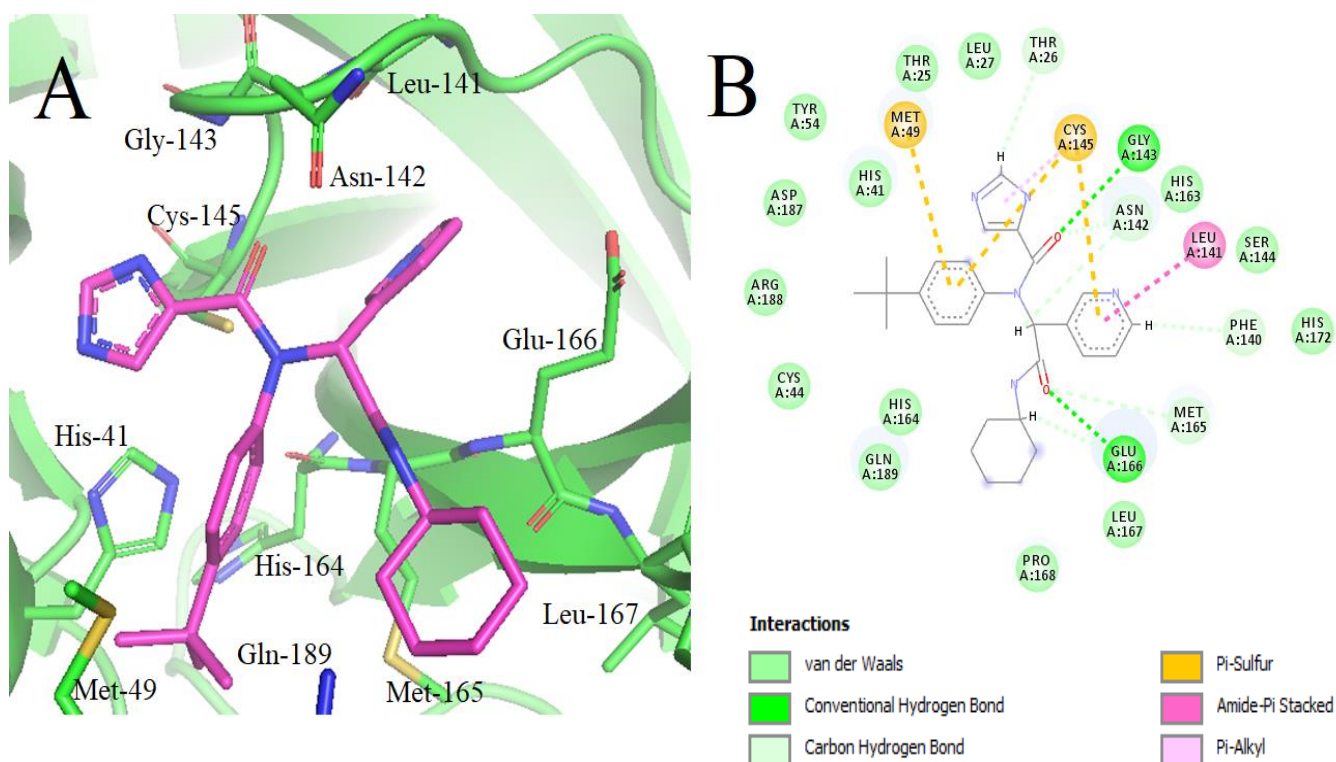
interacting with the catalytic dyad (His41 and Cys145) of the receptor (Qamar et al., 2020). The catalytically active 3CLpro is a dimer. Cleavage by 3CLpro occurs in the glutamine residue of the substrate via the protease Cys-145 and His-41 dyad in which the cysteine thiol functions as the nucleophile in the proteolytic process (Anand et al., 2003). Predicted binding affinities showed that, although X77 presented the stronger affinity, the quassinoids showed similar values compared to X77 (Table 4).

Table 4. Predicted binding affinity, intermolecular energies, and key interacting receptor residues of docked poses of isobrucein B, neosergeolide and redocked pose of X77 within SARS-CoV-2 3CLpro binding site.

Ligand	Affinity (kcal/mol)	Van der Waals energy (kcal/mol)	Electrostatic energy (kcal/mol)	Key interacting residues
Isobrucein B	-8.024	-23.019	-5.398	His-41, Asn-142, Cys-145 and Glu-166
Neosergeolide	-8.248	-23.116	-8.630	Glu-166, Ser-144, Cys-145, Gln-189
X77	-9.558	-38.182	-7.684	His-41, Met-49, Leu-141, Gly-143, Cys-145, Glu-166

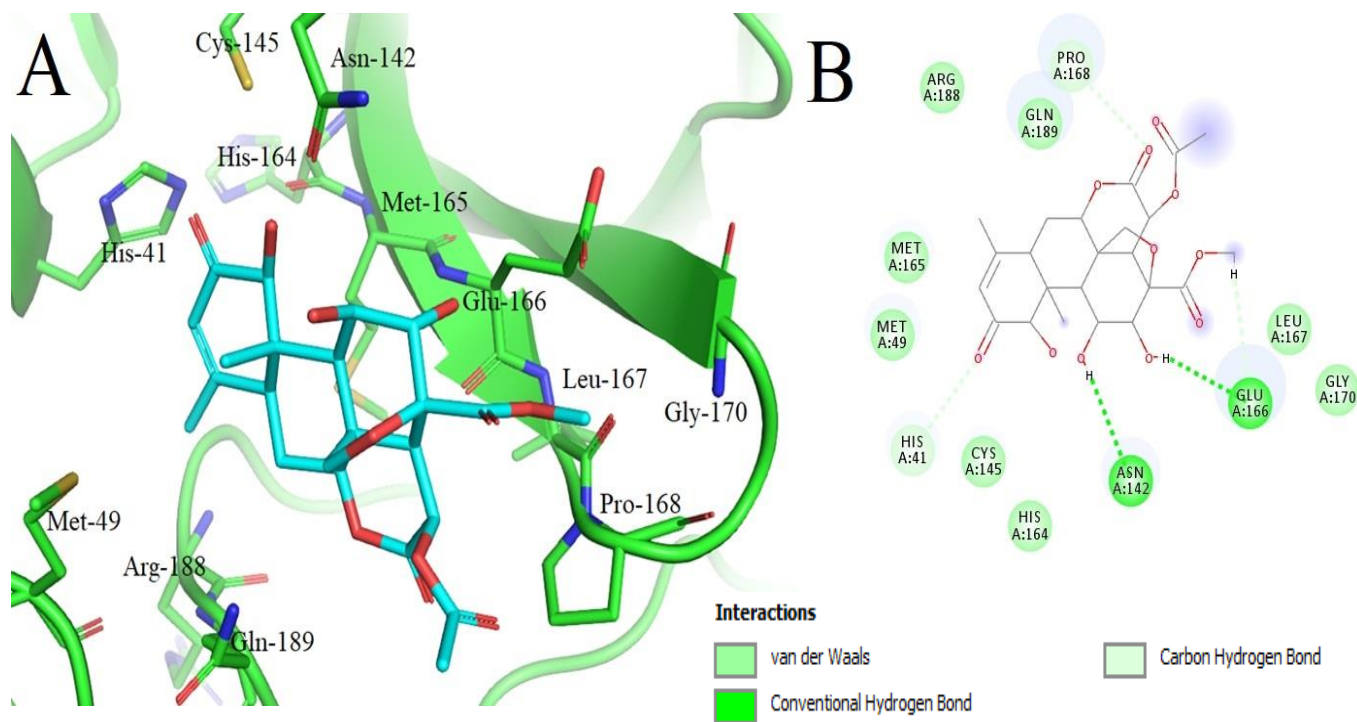
Source: Authors (2021).

Figure 6. (A) 3D docking model of X77 (carbon atoms in purple) within the SARS-CoV-2 3CLpro binding site, highlighting the main intermolecular interactions with residues. (B) 2D interaction diagram between the X77 and receptor residues.



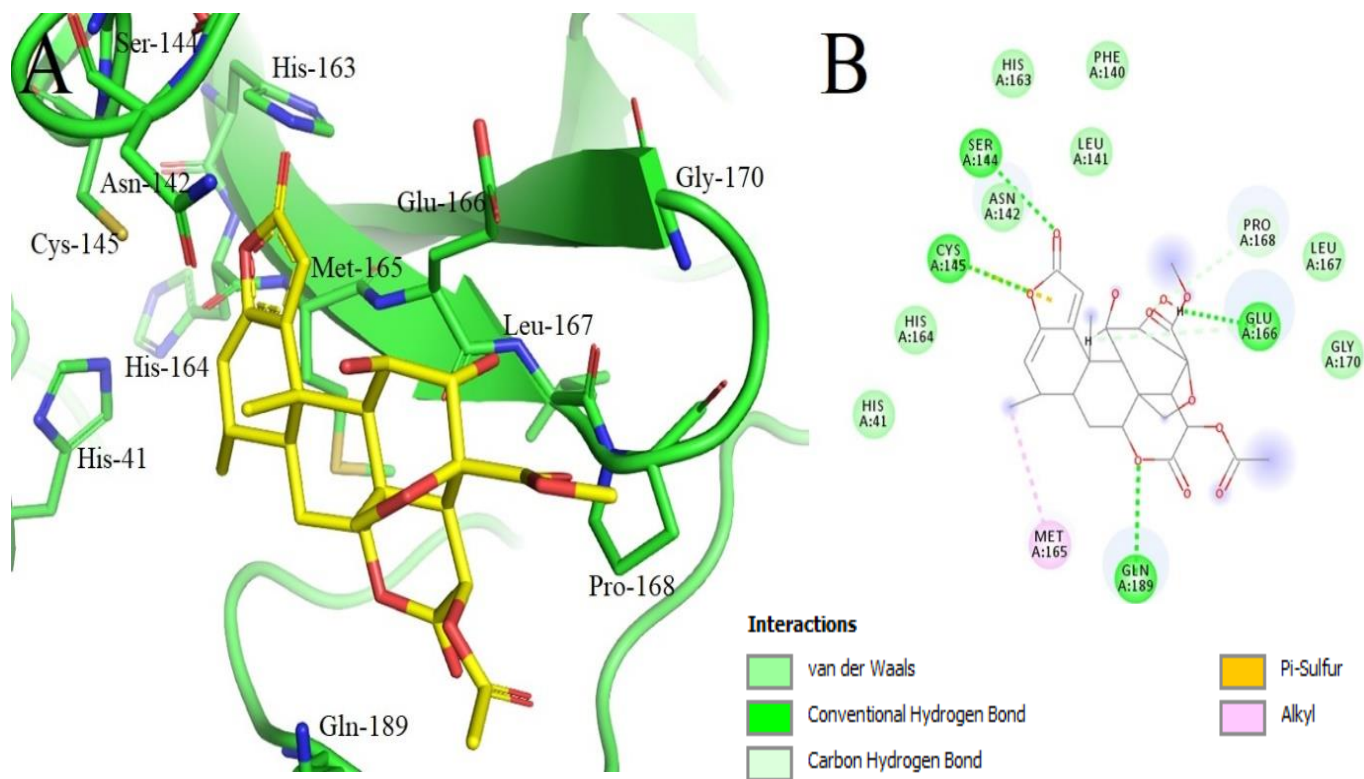
Source: Authors (2021).

Figure 7. (A) 3D docking model of isobrucein B (carbon atoms in cyan) within the SARS-CoV-2 3CLpro binding site, highlighting the main intermolecular interactions with residues. (B) 2D interaction diagram between the isobrucein B and receptor residues.



Source: Authors (2021).

Figure 8. (A) 3D docking model of neosergeolide (carbon atoms in yellow) within SARS-CoV-2 3CLpro binding site, highlighting the main intermolecular interactions with residues. (B) 2D interaction diagram between the neosergeolide and receptor residues.



Source: Authors (2021).

Docking simulations with SARS-CoV-2 RdRp revealed that the quassinoids may bind at the nucleoside triphosphates (NTP) binding pocket. This active site includes motif A (residues 611-626), with the classic divalent cation-binding residue 618, and motif C (residues 753-767), with the catalytic residues 759-761 (Gao et al., 2020). The compounds isobrucein B, neosergeolide and theaflavin performed interactions with these key residues mainly by HB, Van der Waals, and Pi interactions (Figure 9-11). The binding across the RNA tunnel potentially blocks the access of NTPs to the active site on one side and of RNA on the other. Without NTPs, RNA replication cannot occur, thus blocking viral replication (Pokhrel et al 2020). The binding affinities of the compounds with the receptor were similar when compared to the values obtained for theaflavin (Table 5).

Table 5. Predicted binding affinity, intermolecular energies, and key interacting receptor residues of docked poses of isobrucein B, neosergeolide and theaflavin within the SARS-CoV-2 RdRp binding site.

Ligand	Affinity (kcal/mol)	Van der Waals energy (kcal/mol)	Electrostatic energy (kcal/mol)	Key interacting residues
Isobrucein B	-7.500	-11.971	-26.312	Lys-551, Asp-618, Lys-798, Trp-800 and Glu-811
Neosergeolide	-7.388	-21.629	-17.490	Arg-553, Asp-618, Tyr-619, Lys-621, Asp-761,
theaflavin	-7.671	-8.245	-52.988	Arg-553, Asp-618, Asp-623, Asp-760, Asp-761 and Lys-798

Source: Authors (2021).

Figure 9. (A) 3D docking model of isobrucein B (carbon atoms in cyan) within the SARS-CoV-2 RdRp binding site, highlighting the main intermolecular interactions with residues. (B) 2D interaction diagram between isobrucein B and the receptor residues.

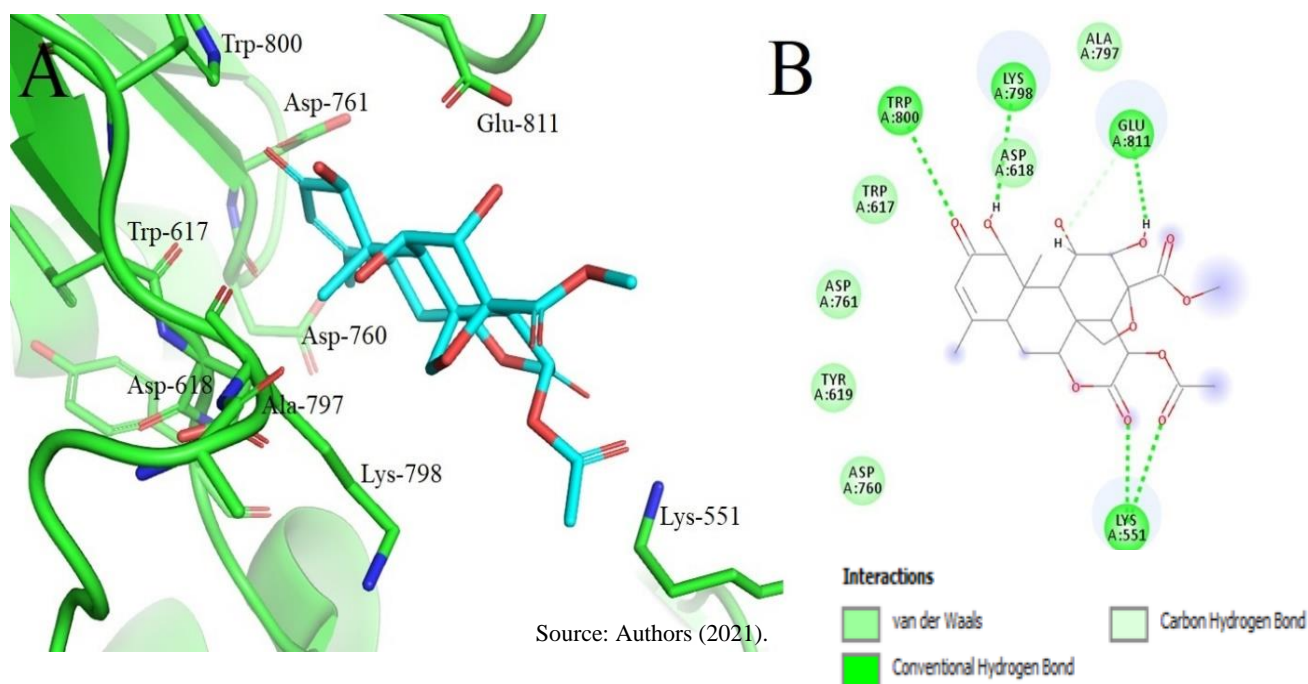


Figure 10. (A) 3D docking model of neosergeolide (carbon atoms in yellow) within the SARS-CoV-2 RdRp binding site, highlighting the main intermolecular interactions with residues. (B) 2D interaction diagram between neosergeolide and the receptor residues.

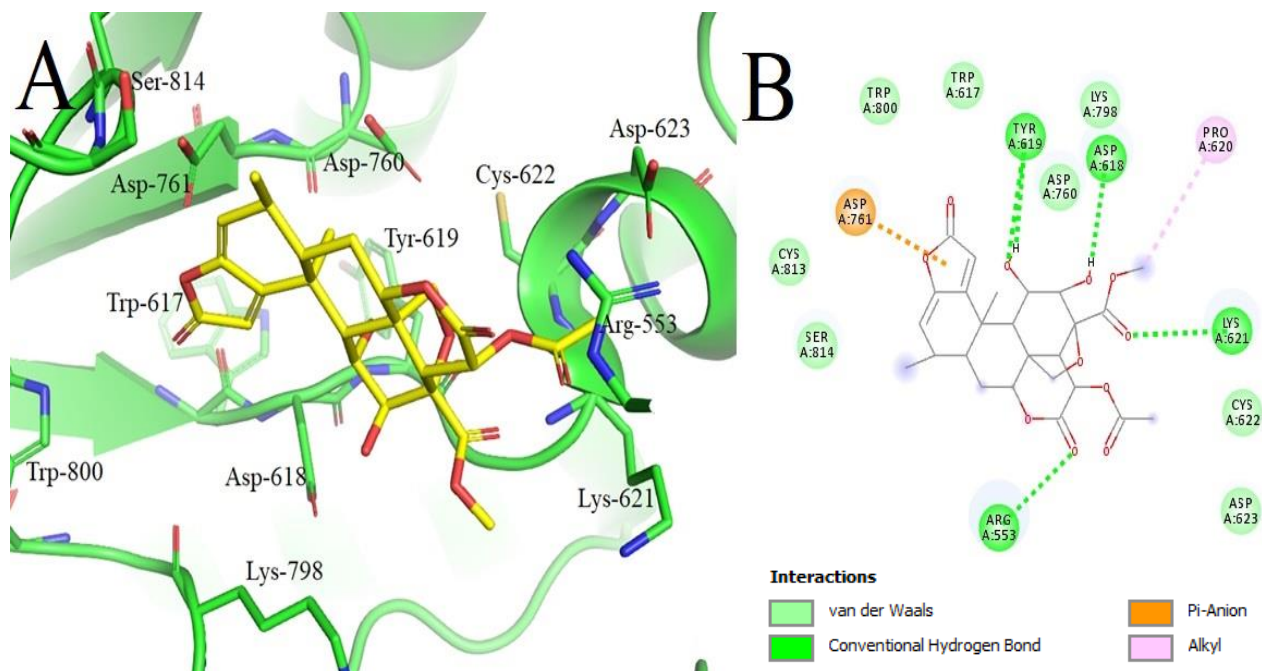
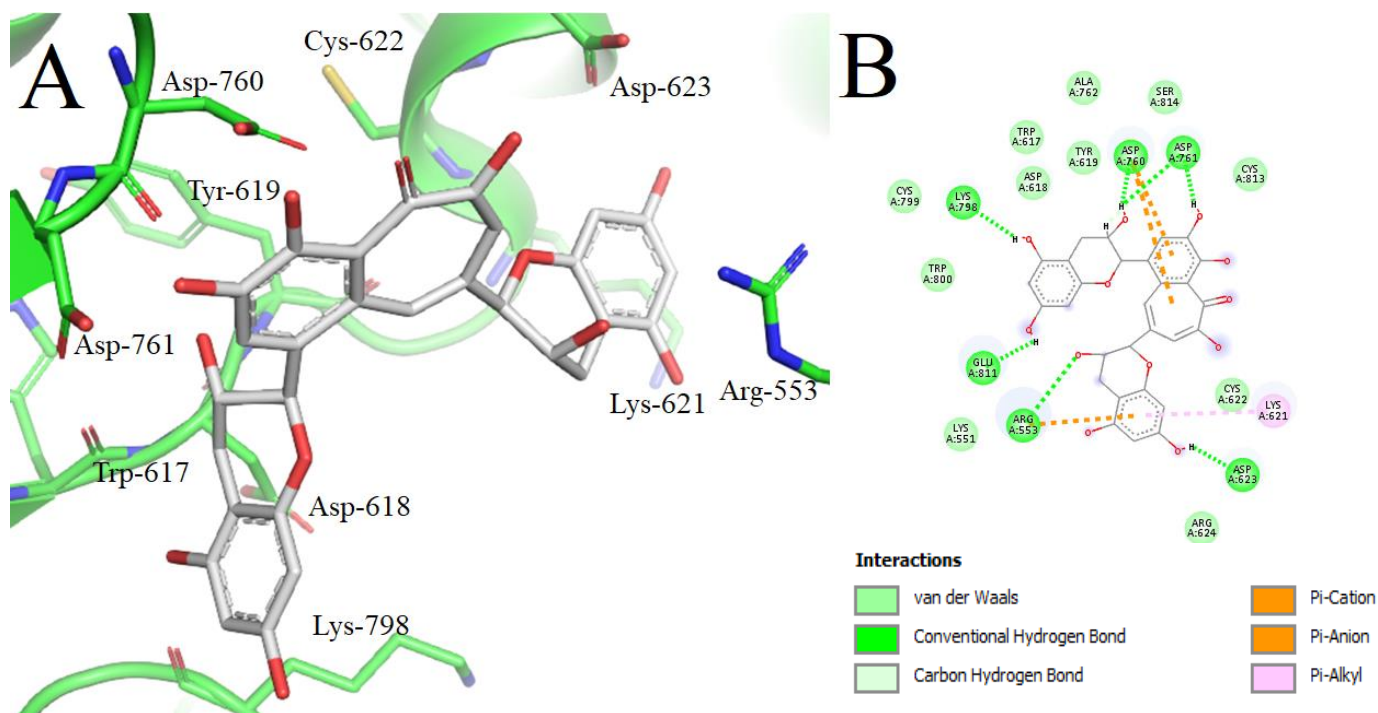


Figure 11. (A) 3D docking model of theaflavin (carbon atoms in gray) within the SARS-CoV-2 RdRp binding site, highlighting the main intermolecular interactions with the residues. (B) 2D interaction diagram between theaflavin and the receptor residues.



Source: Authors (2021).

Molecular modeling, including several *in silico* experiments, has become an essential tool for the planning and development of drugs for various diseases. A series of comparative evaluations of docking programs carried out over the past few years have indicated that the programs, as well as the molecular docking method, can generate binding forms that are like those already experimentally determined and that have already been published in the literature (Zaheer-ul-haq et al., 2010). The results of the molecular docking simulations in this work propose the quassinoids' capacity to interact with key amino acids residues in SARS-CoV-2 targets, which shows the potential of isobrucein B and neosergeolide as possible inhibitors of the SARS-CoV-2 target proteins 3CLpro and RdRp. Few molecular docking studies using quassinoids and SARS-Cov-2 have been reported, and no studies using quassinoids from *P. sprucei* and SARS-CoV-2 have been reported yet. Some studies have shown that compounds of natural origin have potential SARS-CoV-2 inhibitors.

Rahmatullah et al. (2020) carried out a molecular docking study with the 3CLpro protein from SARS-CoV-2 with 12 Javanicins, which are quassinoids found in the *Picrasma javanica* species from the Simaroubaceae family. The quassinoid Javanicin G showed the greatest affinity for SARS-CoV-2 3CLpro with a binding energy of -8.2 kcal/mol. This result found by these authors corroborates the result found for neosergeolide and 3CLpro protein, in which neosergeolide also presented an affinity of -8.248 kcal/mol.

Hasan et al. (2020) reported the interaction of 7 quassinoid javanicolides found in *Brucea javanica* with 3CLpro. Javanicolide B showed a higher affinity for 3CLpro with a binding energy of -7.9 kcal/mol. Pele et al. (2020) evaluated some antimalarial compounds of natural origin for SARS-CoV-2 3CLpro. In the study, the following antimalarials quinine, primaquine, atovaquone, artesunate, and proguanil presented binding affinity values -6.508 kcal/mol, -6.361 kcal/mol, -5.493 kcal/mol, -4.862 kcal/mol, and -4.842 kcal/mol, respectively. These values are lower than the quassinoids isobrucein B and neosergeolide, for which the binding affinity value was -8.024 kcal/mol and -8.248 kcal/mol for this target.

Guedes et al. (2021) evaluated the repositioning of drugs using the SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp targets. These drugs are already used in clinical practice and were analyzed against the SARS-CoV-2 targets mentioned above. Some of these drugs had a binding affinity value for 3CLpro and RdRp that was lower than the quassinoids studied in this work, bearing in mind that the more negative (and further from zero) the value of ΔG° , the more affinity the ligand has for the target. Some antimalarial drugs, such as chloroquine, hydroxychloroquine, and mefloquine, had values of -8.06 kcal/mol, -7.83 kcal/mol, and -7.46 kcal/mol, respectively for the 3CLpro target. In contrast, the quassinoid neosergeolide showed a higher affinity with a value of -8.248 kcal/mol for the same target. Isobrucein B had greater affinity than the values shown by hydroxychloroquine and mefloquine, and a value close to the value of chloroquine with a binding affinity value of -8.024 kcal/mol.

As for the RdRp target of SARS-CoV-2 in the same study by Guedes et al. (2021), the binding affinity values for the drugs chloroquine, hydroxychloroquine, and mefloquine were -7.49 kcal/mol, -7.42 kcal/mol, and -7.03 kcal/mol, respectively. Isobrucein B had a binding affinity value of -7.500 kcal/mol, slightly higher than those of chloroquine and hydroxychloroquine, and a higher binding affinity for the RdRp target than mefloquine. For this target, the quassinoid neosergeolide had an affinity value a little lower than that of chloroquine and hydroxychloroquine and greater than the value of mefloquine, with a binding affinity of -7.388 kcal/mol.

4. Conclusion

Using the qNMR technique, which until now had not been used for the quassinoids of the species *P. sprucei*, it was possible to quantify them in the F2-F3 fraction. The *in silico* results suggest that the quassinoids isobrucein B and neosergeolide are interesting starting points for obtaining novel SARS-CoV-2 inhibitors with therapeutic potential in the treatment of COVID-19. This is the first study of the binding of *P. sprucei* quassinoids (by molecular docking) to key proteins of SARS-CoV-2 that play an important role in inhibiting virus replication. Thus, these two quassinoids may play an essential role as inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro and RdRp.

Analyses *in vitro* and *in vivo* are needed to corroborate the reported docking results and the proper application and further optimization of these substances. The knowledge obtained in this study may be essential for exploring and developing new candidates for natural therapeutic agents against COVID-19. Furthermore, it is also fundamental that we investigate the risks of *P. sprucei* as a phytomedicine for use against COVID-19.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES and the Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica of UFAM and Central Analítica at UFAM for the use of its infrastructure, its financial support and internships.

References

- Amorim, R. C. N. (2009). Contribuições para o conhecimento da composição química e atividade biológica de infusões, extratos e quassinóides obtidos de *Picrolemma sprucei* Hook.f. (Simaroubaceae). Tese de Doutorado em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
- Anand, K., Ziebuhr, J., Wadhwani, P., Mesters, J. R. & Hilgenfeld, R. (2003). Coronavirus Main Proteinase (3CLpro) Structure: Basis for Design of Anti-SARS Drugs. *Science*, 300, 1763–1767.
- Andrade-Neto, V. F., Pohlit, A. M., Pinto, A. C. S., Silva, E. C. C., Nogueira, K. L., Melo, M. R. S., Henrique, M. C., Amorim, R. C. N., Silva L. F. R. & Costa, M. R. F. (2007). *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(3), 359–366.

- Beyer, T., Schollmayer, C., Holzgrabe, U. (2010). The role of solvents in the signal separation for quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 52, 51–58.
- Braga, R. C., Alves, V. M., Muratov, E. N., Strickland, J., Kleinstreuer, N., Tropsha, A. & Andrade, C. H. J. (2017). Pred-Skin: A Fast and Reliable Web Application to Assess Skin Sensitization Effect of Chemicals. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 57 (5), 1013–1017.
- Braga, R. C., Alves, V. M., Silva, M. F. B., Muratov, E., Fourches, D., Liao, L. M., Tropsha, A. & Andrade, C. H. (2015). Pred-hERG: A novel web-accessible computational tool for predicting cardiac toxicity. *Molecular Informatics*, 34, 698-701.
- Burton, I. W., Quilliam, M. A. & Walter, J. A. (2005). Quantitative ¹H NMR with external standards: use in preparation of calibration solutions for algal toxins and other natural products. *Analytical Chemistry*, 77, 3123–3131.
- Cheng, F., Li, W., Zhou, Y., Shen, J., Wu, Z., Liu, G., Lee, P.W. & Tang, Y. (2012). AdmetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52, 3099–3105.
- Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 42717.
- Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S. & Roy, A. S. (2020). An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1-11.
- Da Silva, F. M. A., da Silva, K. P. A., de Oliveira, L. P. M., Costa, E. V., Koolen, H. H. F., Pinheiro, M. L. B., de Souza, A. Q. L. & de Souza, A. D. L. (2020). Flavonoid glycosides and their putative human metabolites as potential inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease (Mpro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 115, 1–8.
- Dong, E., Du, H. & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time, *Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 533-534.
- Ferreira, M. C. (2000). O mercado de plantas medicinais em Manaus. In: A floresta em jogo. O extrativismo na Amazônia Central. Editor: L' Orstom. Editora científica Laure Empeaire, tradução brasileira Editora da UNESP, 177-181.
- Fukamiya, N., Lee, K. H., Muhammad, I., Murakami, C., Okano, M., Harvey, I., Pelletier, J. (2005). Structure-activity relationships of quassinoids for eukaryotic protein synthesis. *Cancer Letter*, 220, 37-48.
- Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L. W., Wang, Q., Lou, Z. & Rao, Z. (2020). Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. *Science*, 368(6492), 779-782.
- Ghahremanpour, M. M., Tirado-Rives, J., Deshmukh, M., Ippolito, J. A., Zhang, C.H., Vaca, I.C., Liosi, M. E., Anderson, K. S. & Jorgensen, W. L. (2020). Identification of 14 known drugs as inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 11(12), 2526-2533.
- Guan, L., Yang, H., Cai, Y., Sun, L., Di, P., Li, W., Liu, G. & Tang, Y. (2018). ADMET- score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Medchemcomm*, 10(1), 148-157.
- Guedes, I. A., Costa, L. S. C., Santos, K. B., Karl, A. L. M., Rocha, G. K., Teixeira, I. M., Galheigo, M. M., Medeiros, V., Krempser, E., Custódio, F. L., Barbosa, H. J. C., Nicolás, M. F. & Dardeme L. E. (2021). Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. *Scientific Reports*, 11, 5543.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A. & Sindelar, R. D. (2005). Biologically active quassinoids and their chemistry: Potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 173-190.
- Hahn, M. Receptor Surface Models. 1. Definition and Construction. (1995). *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 12, 2080–2090.
- Hasan, A., Mahamud R. A., Bondhon, T. A., Jannat, K., Jahan, R., Rahmatullah M. (2020). Can javanicins be potential inhibitors of SARS-CoV-2 C-3 like protease? An evaluation through molecular docking studies. *Journal of Natural & Ayurvedic Medicine*, 4(2), 000250.
- Hasan, A., Mahamud, R. A., Bondhon, T. A., Jannat, K., Farzana, B., Jahan & Rahmatullah, M. (2020). Molecular docking of quassinoid compounds javanicolides A-F and H with C3-like protease (or 3CL pro) of SARS and SARS-C0V-2 (COVID-19) and VP8* domain of the outer capsid protein VP4 of rotavirus A. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2020; 8(4 Part A):14-19.
- Kleinstreuer, N. C., Hoffmann, S., Alépée, N., Allen, D., Ashikaga, T., Casey, W., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Göbel, C., Kern, P. S., Klaric, M., Kühnl, J., Martinuzzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Strickland, J., van Vliet, E., Zang, Q. & Petersohn D. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches*. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(5), 359-374.
- Le Cointe, P. (1947). Árvores e plantas úteis (Amazônia brasileira III). Companhia Editora Nacional, 92.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P.J. (1997). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.
- Moretti, C., Polonsky, J., Vuilhorgne, M. & Prange, T. Isolation and structure of sergeolide a potent cytotoxic quassinoid from *Piccolema pseudocoffea*. *Tetrahedron Letters*, 23(6), 647-650, 1982.
- Morse, J. S., Lalonde, T., Xu, S. & Liu, W. R. (2020) Learning from the past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV. *ChemBioChem*, 21(5), 730-738.
- Mortelmans, K. & Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. (2000). *Mutation Research*, 20;455(1-2):29-60.

- Neves, K. O. G., Ramos, A. S., Bruginiski, E. R. D., De Souza, A. D. L., Nunomura, R. C. S., Campos, F. R., Da Silva, F. M. A. & Machado, M. B. (2021). Lisboaeflavanonol A: A new flavonoid glycoside obtained from Amazonian *Eugenia lisboae*. *Phytochemistry Letters*, 43, 65-69.
- Nunomura, R. C. S., Silva, E. C. C., Oliveira, D. F., Garcia, A. M., Boeloni, J. N., Nunomura S. M. & Pohlit, A. M. (2006). *In vitro* studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). *Acta Amazonica*, 36, 327-330.
- Nunomura, R. C. S., Silva, E. C. C., Nunomura, S. M., Amaral, A. C. F., Barreto, A. S., Siani A. C., Pohlit, A. M. (2012). Quantification of antimalarial quassinoids neosergeolide and isobrucein b in stem and root infusions of *Picrolemma sprucei* Hook F. by HPLC-UV analysis. *Chromatography and Its Applications*, 187-200.
- Oliveira, E. S. C., Pontes, F. L. D., Acho, L. D. R., do Rosário, A. S., da Silva, B. J. P., de A Bezerra, J., Campos, F. R., Lima, E. S. & Machado, M. B. (2021). qNMR quantification of phenolic compounds in dry extract of *Myrcia multiflora* leaves and its antioxidant, anti-AGE, and enzymatic inhibition activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 201:114109.
- Peele, K. A., Potla, D. C., Srihansa, T., Krupanidhi, S., Ayyagari, V. S., Babu, D. J., Indira, M., Reddy, A. R., & Venkateswarulu T. C. (2020). Molecular docking and dynamic simulations for antiviral compounds against SARS-CoV-2: a computational study. *Informatics in Medicine Unlocked*, 19, 100345.
- Pires, D. E., Blundell, T. L. & Ascher, D. B., (2015). pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 4066-4072.
- Pohlit, A. M., Jabor, V. A. P., Amorim, R. C. N., Silva, E. C. C. & Lopes, N. P. (2009). LC-ESI-MS Determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma sprucei* stem infusions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 20(6), 1065-1070.
- Pokhrel, R., Chapagain, P. & Siltberg-Liberles, J. (2020). Potential RNA-dependent RNA polymerase inhibitors as prospective therapeutics against SARS-CoV-2. *Journal of Medical Microbiology*, 69(6), 864-873.
- Priest, B. T., Bell, I. M. & Garcia, M. L. (2008). Role of hERG potassium channel assays in drug development. *Channels (Austin)*, 2(2), 87-93.
- Qamar, M. T., Alqahtani, S. M., Alamri, M. A. & Chen, L. L. (2020). Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(4), 313-319.
- Ribeiro, J. E. L.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. (1999). Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus-AM, INPA, p. 547-549.
- Rim, K. T. (2020). *In silico* prediction of toxicity and its applications for chemicals at work [published online ahead of print, 2020 May 14]. *Toxicol Environ Health Sci*, 1-12.
- Saraiva, R. C. G. (2001). Estudo Fitoquímico de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae) e Dosagem dos Princípios Antimaláricos nos Chás do Caule e Raiz. Dissertação de Mestrado em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
- Saraiva, R. C. G., Barreto, A.S., Siani, A.C., Ferreira, J.L.P., Araujo, R.B., Nunomura, S.M. & Pohlit, A.M. (2002). Anatomia foliar e caulinar de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae). *Acta Amazonica*. 33(2) 213-220.
- Shou, W. Z. (2020). Current status and future directions of high-throughput ADME screening in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 10(3), 201-208.
- Silva, E. C. C. (2006). Isolamento, transformação química e atividade biológica *in vitro* dos quassinóides neosergeolida e isobruceína B. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 2006.
- Thomas, W. W. (1990) The American genera of Simaroubaceae and their distribution. *Acta Botanica Brasilica*, 4 (1), 11-18.
- Tyburn, J. M. & Coutant, J. (2016). TopSpin ERETIC 2 - Electronic to Access *In vivo* Concentration User Manual, 1-34.
- Vieira, I. J. C., Rodrigues, E., Fernandes, J. B. & Silva, M. F. G. F. (2000). Complete ¹H and ¹³C chemical shift assignments of a new C22-quassinoid isolated from *Picrolemma sprucei* Hook by NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38, 805-808.
- World Health Organization. (2021). *Coronavirus disease (COVID-19) situation reports*. Retrieved from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Accessed 19 June 2021.
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang Y, Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., Zheng, M., Chen, L. & Li, H. (2020) Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(5), 766-88.
- Wu, Y. & Wang, G., Machine Learning Based Toxicity Prediction: From Chemical Structural Description to Transcriptome Analysis. (2018). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2358.
- Yu, R., Chen, L., Lan, R., Shen, R. & Li, P. (2020). Computational screening of antagonist against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020; 56(2), 106012.
- Zaheer-Ul-Haq, Halim, S. A., Uddin, R., & Madura, J. D. (2010). Benchmarking docking and scoring protocol for the identification of potential acetylcholinesterase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 28(8), p. 870-882.
- 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., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 382(8), 727-733.
- Zukerman-Schpector, J., Castellano, E. E., Fho, E.R. & Vieira, I. J. C. (1994). A new quassinoid isolated from *Picrolemma pseudocoffea*. *Acta Crystallographica C*, 50, 794-797.