

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS DE SÃO BERNARDO - CCSB
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS NATURAIS/ QUÍMICA

BÁRBARA BRITO ROCHA

**AVALIAÇÃO IN SÍLICO DE FÁRMACOS DIURÉTICOS REPOSICIONADOS
COMO INIBIDOR DE PROTEÍNAS DO SARS-COV-2.**

São Bernardo- MA

2022

BÁRBARA BRITO ROCHA

**AVALIAÇÃO IN SÍLICO DE FÁRMACOS DIURÉTICOS REPOSICIONADOS
COMO INIBIDOR DE PROTEÍNAS DO SARS-COV-2.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Federal do Maranhão- UFMA Campus de São
Bernardo-MA, com requisito para a obtenção do título de
Licenciatura em Ciências Naturais/Química.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha

São Bernardo- MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Brito Rocha, Bárbara.

Avaliação in silico de fármacos diuréticos
reposicionados como inibidor de proteínas do SARS-COV-2 /
Bárbara Brito Rocha. - 2022.

44 p.

Orientador(a): Jefferson Almeida Rocha.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Naturais -
Química, Universidade Federal do Maranhão, São Bernardo-
MA, 2022.

1. Coronavírus. 2. Docagem molecular. 3. Fármacos
Diurético. I. Almeida Rocha, Jefferson. II. Título.

BÁRBARA BRITO ROCHA

**AVALIAÇÃO IN SÍLICO DE FÁRMACOS DIURÉTICOS REPOSICIONADOS
COMO INIBIDOR DE PROTEÍNAS DO SARS-COV-2.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Universidade Federal do Maranhão- UFMA Campus de São Bernardo-MA, com requisito para a obtenção do título de Licenciatura em Ciências Naturais/Química.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha

Aprovado em 26/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^o. Dr. Jefferson Almeida Rocha
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof^o. Dr. Josberg Siva Rodrigues
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Msc. Paulo Sérgio de Araújo Sousa
Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAR

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, que me possibilitou chegar até esse momento, pela força, coragem, persistência, sabedoria e dias de ânimo que me deste, foram dias de lutas e alguns difíceis, muitas vezes pensei em desistir, mas graças a Deus consegui continuar e chegar na reta final;

Agradeço ao meu pai José Wilson (In Memoriam), que apesar de não está presente fisicamente nesse momento, foi a pessoa que mais acreditou em mim e no meu potencial, sempre me ajudando e incentivando a continuar, sem ele e minha mãe Naiara não teria conseguido; agradeço a minha amada irmã Ágatha, avós, tios (a), primos (a) e namorado, por acreditarem, incentivarem e pela paciência ao longo desses anos, em especial a minha tia Sinária, meu primo Miquéias, minha tia Flavinha e meus avós maternos Rosa Maria e Chaga Brito, agradeço por sempre me motivarem e acreditarem em mim;

Aos meus colegas e amigos de curso Verônica, Daniel, Samuel, Aldair, Yan, Erneron, Antônio Eduardo, Juliana, Marcelo, Matheus, Paty e muitos outros que trilharam junto comigo, pessoas que convivi em todos esses anos, agradeço por terem feito desses anos mais fáceis e felizes, sempre torcendo e ajudando de alguma maneira, sou grata por compartilhar tantos momentos com vocês, em especial agradeço a minha amiga e parceira acadêmica Ianca, obrigada por tanto, por cada palavra e por sempre me motivar e acreditar em mim;

Agradeço aos meus amigos de vida, Vanessa, Karol, Thomas, Marília, Vitória e em especial minha amiga Danny, obrigada pelo apoio de sempre meus amigos;

Agradeço aos meus queridos companheiros de grupo de pesquisa QUIMEBIO, grupo esse que iniciou com cinco participantes, e hoje, já transformou a vida de muitos, sou grata por me acolherem tão bem e de ter tido a honra de participar por quase dois anos do mesmo, resalto também a importância do programa Residência Pedagógica, agradeço aos meus colegas residentes, professor orientador e preceptora por cada ensinamento, sem dúvidas foi uma experiência única e desafiadora, porém, que enriqueceu meus conhecimentos;

Agradeço aos meus professores por cada ensinamento, consegui aprender muito com cada um, agradeço por contribuírem para minha formação, agradeço em especial ao meu orientador Jefferson Almeida Rocha, obrigada por me acolher tão bem no grupo de pesquisa QUIMEBIO, obrigada por aceitar orientar-me, obrigada por cada palavra de motivação e por suas orientações. GRATIDÃO A TODOS E MUITO OBRIGADA, MEU CORAÇÃO ESTÁ TRANSBORDANDO DE FELICIDADES E GRATIDÃO.

RESUMO

Em dezembro de 2019, surgiu na China o novo coronavírus (Sars-Cov-2) e se espalhou rapidamente por todo o planeta causando uma pandemia e, conseqüentemente, milhares de mortes. Apesar do grande esforço da ciência ainda não existem fármacos comprovadamente eficazes contra a Covid-19, sendo necessário estudos que venham a agregar esta possibilidade visto a permanência do vírus em nossa sociedade. Diante disso, a presente pesquisa realizou uma avaliação *in silico* de fármacos diuréticos reposicionados por docagem molecular como inibidor de proteínas do coronavírus Sars-Cov-2. A metodologia utilizada para esta pesquisa constituiu-se de buscas em bancos de dados de produções científicas para uma prospecção dos diuréticos. As docagens realizadas com os diuréticos e as proteínas do vírus foram feitas no programa AutoDock e Vina, posteriormente, os arquivos de proteínas foram preparados pela remoção de todas as moléculas de água e outros grupos, como íons, usando o software Chimera. Os resultados obtidos a partir da interação dos diuréticos com a proteína Spike, revelaram que o Metolazone apresentou a maior afinidade molecular, com energia de ligação de -7.37 kcal/mol⁻¹; com a proteína Spike o Torseomide apresentou energia de ligação de -7.25 kcal/mol⁻¹, revelando-se como a maior afinidade; também com a proteína spike, o Bendroflumethiazide demonstrou a maior afinidade molecular, com energia de ligação de -6.18 kcal/mol⁻¹ e a Espirolactona apresentou energia de ligação de -8.1 kcal/mol⁻¹; com a ECA2 o Bendrolumethiazide teve a maior afinidade, com energia de ligação de -7.0 kcal/mol⁻¹; já com o complexo ECA2/Spike o diurético de maior afinidade foi o Chlorthalidone, com energia de ligação de -7.1 kcal/mol⁻¹ e por fim, a interação dos diuréticos com a proteína mPRO demonstrou que a Espirolactona mais uma vez apresentou maior afinidade molecular, com energia de ligação com valor de -7.4 kcal/mol⁻¹. Assim, podemos propor que os diuréticos Bendroflumethiazide e o Espirolactona podem ser bons candidatos ao reposicionamento de fármacos no combate ao coronavírus.

Palavras-chave: Coronavírus. Fármacos Diurético. Docagem molecular.

ABSTRACT

In December 2019, the new coronavirus (Sars-Cov-2) emerged in China and spread rapidly across the planet, causing a pandemic and, consequently, thousands of deaths. Therefore, the present research carried out an *in silico* evaluation of diuretic and anticoagulant drugs repositioned by molecular docking as an inhibitor of the S-binding protein in the ACEII cell receptor of the Sars-Cov-2 coronavirus. The methodology used for this research consisted of searches in databases of scientific productions for a scientific prospection of diuretics. Dockings performed with the diuretics and virus proteins were performed in the AutoDock program and, later, the protein files were prepared by removing all water molecules and other groups, such as ions, using the Chimera software. The results obtained from the interaction of diuretics with the Spike protein revealed that Metolazone had the highest molecular affinity, with binding energy of $-7.37 \text{ kcal/mol}^{-1}$. With the 6VYB protein, Torsemide presented binding energy of $7.25 \text{ kcal/mol}^{-1}$, revealing itself as the highest affinity. With the 6VYB protein with site 2 coordinates, Bendroflumethiazide demonstrated the highest molecular affinity, with binding energy of $-6.18 \text{ kcal/mol}^{-1}$. With the spike protein with site 2, Spirolactone showed binding energy of $-8.1 \text{ kcal/mol}^{-1}$, the highest being presented. With ACE2, Bendrolumethiazide had the highest affinity, with binding energy of $-7.0 \text{ kcal/mol}^{-1}$. With the ACE2/Spike complex, the diuretic with the highest affinity was Chlorthalidone, with a binding energy of $-7.1 \text{ kcal/mol}^{-1}$. And finally, the interaction of the diuretics with the mPRO protein showed that Spirolactone once again showed greater affinity molecular, with binding energy of $-7.4 \text{ kcal/mol}^{-1}$. Thus, we can propose that the diuretics Bendroflumethiazide and Spirolactone may be good candidates for drug replacement in the fight against coronavirus.

Keywords: Coronavirus. Diuretic drugs. Molecular docking.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivo específicos.....	13
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1 Coronavírus:.....	14
3.2 Reposicionamento de Fármacos.....	17
3.3 BIOINFORMÁTICA.....	18
3.4 OS DIURÉTICOS.....	21
4. METODOLOGIA.....	26
4.1 Prospecção de fármacos diuréticos.....	26
4.2 Docagem molecular.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIA.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína Spike aberta (6VXX) do novo coronavírus COVID-19;

Tabela 02: Parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína Spike fechada (6VYB) no sítio ativo 01 do novo coronavírus COVID-19;

Tabela 03: Parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína Spike fechada (6VYB) no sítio ativo 02 do novo coronavírus COVID-19;

Tabela 04: Parâmetros de afinidade molecular pelo método vina em ΔG_{bind} (kcal/mol) entre os diuréticos com a proteína Spike (S), proteína ECA2, complexo ECA2/Spike e proteína mPRO do novo coronavírus Covid-19.

LISTA DE IMAGENS

Figura 01: Estrutura química bidimensional dos diuréticos selecionados mais utilizados na literatura com aplicações medicinais;

Figura 02: Interação molecular do fármaco diurético Espirolactona (azul) com a proteína spike (bege). a) sítio ativo do acoplamento ligante-proteína em 3d, b) local da interação da Espirolactona com os aminoácidos em 3d e c) interações hidrofóbicas e por ponte de hidrogênio da Espirolactona em 2d.

Figura 03: Interação molecular do fármaco Chlorthalidone com as proteínas spike (azul) e ECA (vermelho). a) sítio ativo do acoplamento ligante-proteína em 3d, b) local da interação do Chlorthalidone com os aminoácidos (laranja) em 3d e c) interações hidrofóbicas e por ponte de hidrogênio do Chlorthalidone em 2d.

1. INTRODUÇÃO

O novo coronavírus (Sars-Cov-2) surgiu na China, a partir de dezembro de 2019 e se espalhou rapidamente por todo o planeta provocando uma pandemia. Esse vírus realiza a sua replicação por uma fita simples de RNA no seu interior, de sentido positivo (Fehr;Perlman, et al., 2015), e é comumente encontrado em hospedeiros como morcegos e camelos. Estudos anteriores apontam que existem seis linhagens de coronavírus que são capazes de infectar humanos, entre elas quatro circulam anualmente causando gripes comuns e as outras duas podem causar a síndrome respiratória aguda grave (SARS) e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERSCoV) (Liu; Wang, 2020; Cui et al., 2019). Os principais sintomas são: febre, falta de ar, mal-estar, tosse seca, dificuldades respiratórias, problemas renais e pneumonia (Liu; Wang, 2020; Zhu et al., 2020; Lu et al., 2020; Hui et al., 2020).

As micrografias eletrônicas de partículas do Sars-Cov-2, demonstraram a morfologia do vírus que possui um diâmetro que varia de 60 a 140 nm e apresentam uns picos distintos de 9 a 12nm com aparência de uma coroa solar, sua estrutura externa é forma de proteínas S (spike) na qual se ligam nas células humanas pelo receptor ACEII, sendo um importante via de disseminação do vírus, pois atuam convergindo a angiotensina, um hormônio peptídico que controla a vasoconstrição e a pressão sanguínea. (Yan et al., 2020; Wrapp et al., 2020; Zhu et al., 2020). A glicoproteína do pico transmembrana (S), que se projetam na superfície do vírus são formadas por duas subunidades funcionais responsáveis pela ligação ao receptor da célula hospedeira e pela união das membranas virais e celulares. Como a glicoproteína S do coronavírus é exposta na superfície e tem contato com a entrada nas células hospedeiras, essa proteína é o principal alvo dos anticorpos e na formulação de uma vacina (Walls et al., 2020).

A bioinformática tem avançado, nas pesquisas pré-clínicas, uma vez que ela une todas as frentes de pesquisa, dos ensaios virtuais à toxicologia animal, tendo como elemento central a estrutura química. O reconhecimento da estrutura química possibilita a identificação das propriedades química que torna uma substância um fármaco potencial e, desta forma, o planejamento racional de novos compostos fica mais viável, uma vez que os ensaios virtuais requerem menos gastos de reagentes e tempo no laboratório (Gateiger, 2006; Oprea, 2003; Oprea; Matthe, 2004). A biologia computacional traz aos testes biológicos novas possibilidades de modelos de drogas, baseados em simulação computacional, sem a necessidade de desperdício de solventes e reagentes. Essas novas possibilidades devem-se principalmente ao desenvolvimento das metodologias teóricas de simulação e ao desenvolvimento hardware e software na área de informática nos últimos anos (Rocha et al., 2018).

Com o aumento rapidamente da pandemia ocasionada pelo o novo coronavírus e com o grande número de mortes no mundo inteiro ocasionados pelo vírus, esse trabalho tem como intuito ajudar na batalha contra o vírus, sabemos que é um vírus novo e que precisa de muitas pesquisas e estudos para encontrar uma maneira para amenizar o caos no mundo, com isso e com a evolução da ciência e com a melhoria da bioinformática, foram realizados estudos computacionais com fármacos diuréticos, para ajudar no combate do coronavírus.

Os fármacos diuréticos são amplamente utilizados para ajudar no aumento da eliminação do sódio e água por meio da urina. Existe uma grande variedade de fármacos diuréticos que retribuem positivamente quando utilizadas para ajudar no tratamento de algumas doenças. No entanto, com a chegada do novo coronavírus em dezembro de 2019, onde o mesmo apresenta vários sintomas, entre eles problemas respiratórios e que afetam diretamente no pulmão, irão ser estudados diuréticos que possam ser eficientes e conseqüentemente proteger contra o vírus. Com o avanço da bioinformática, em pesquisas pré-clínicas, uma vez que ela junta todas as frentes de pesquisa, dos ensaios virtuais à toxicologia animal, tendo como elemento fundamental a estrutura química.

Com a importância da estrutura química possibilita a identificação das propriedades química que torna uma substância um fármaco potencial e, desta forma, o planejamento racional de novos compostos fica mais viável. Pensando nisso, o presente trabalho justifica a importância dos fármacos diuréticos e anticoagulantes para descobrir novos medicamentos que possam ajudar na luta do coronavírus.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar uma avaliação in silico de fármacos diuréticos reposicionados por docagem molecular como inibidor de proteínas do coronavírus Sars-Cov-2

2.2 Objetivo específicos

- Prospecção de fármacos diuréticos candidatos para os estudos de afinidade molecular;
- Seleção das proteínas no banco de dados;
- Docagem molecular com as proteínas e os ligantes selecionados.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Coronavírus:

3.1.1 Identificação da família Coronaviridae

Não é de hoje que os coronavírus circulam pela população, em meados dos anos 1960, que mundialmente são conhecidos como uma grande família viral, já ocasionavam infecções respiratórias em seres humanos e em animais e foram crescendo ao passar dos anos ao descobrirem novas espécies desse vírus.

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) publicou uma nova classificação para os coronavírus no ano de 2019, onde ressaltou que o coronavírus passaram a pertencer ao domínio Riboviria, pertencente ao reino Orthornavirae, cujo filo é Pisuviricota, sua classe Pisoniviricetes, da ordem Nidovirales, subordem Cornidovirineae e da família Coronaviridae.

A família a qual foi classificado, foi dividida em duas novas subfamílias, que consistem: em: Letovirinae (gênero Alphaletovirus) e Orthocoronavirinae, da qual é dividida em quatro gêneros: Alphacoronavírus, Betacoronavírus, Deltacoronavírus e Gammacoronavírus (ICTV, 2019). Esses gêneros Alphacoronavírus e Betacoronavírus são conhecidos por infectar mamíferos, abrangendo o homem; já os Deltacoronavírus e Gammacoronavírus infectam espécies de aves (ICTV, 2019; Paules et al., 2020). Algumas das principais espécies conhecidas que infectam os humanos são: HCoV-229e, HCoV-NL63 (que pertencem ao gênero Alphacoronavírus), a HCoV-OC43, HCoV-HKU1 (cujo gênero é Betacoronavírus), logo, são responsáveis sobretudo por infecções respiratórias brandas. Ademais do SARS-CoV-2, SARSCoV e MERS-CoV, que fazem parte do gênero Betacoronavírus, que, como citado antes, são responsáveis pela Covid-19, SRAG e MERS, simultaneamente (Shuo et al., 2016; Bulut e Kato, 2020).

3.1.2 Estrutura do Vírus

O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (RNA), o seu material genético é reproduzido por uma única molécula de RNA positivo (RNA+). Todo o seu genoma contém menos de 30.000 nucleotídeos, onde cada um deles é formado por uma molécula de açúcar (ribose), um ácido fosfórico e uma base nitrogenada. Por ser um vírus RNA, as bases nitrogenadas são adenina, citosina, guanina e uracila.

Os coronavírus apresentam um genoma RNA de fita simples, não segmentado, com senso positivo (ssRNA+) (Fung et al, 2019; Paules et al., 2020), sendo considerados grandes,

aproximadamente cerca de 30 kb, com isso, sua tradução é considerada complexa (De Wilde et al., 2017).

Segundo os pesquisadores, em 1965 a estrutura do coronavírus foi descrita semelhante a uma coroa. O nome coronavírus origina-se do Latim, cujo significado do mesmo é coroa ou auréola, referenciando-se à estrutura da sua superfície, podendo ser visualizada a partir de microscopia eletrônica, com projeções que fazem o vírus parecer com uma coroa (RICHMAN et al., 2016). Esses vírus são envelopados, tendo uma morfologia esférica que pode variar de 80 a 120 nanômetros de diâmetro e capsídeo de simetria helicoidal. Em seu envelope (envoltório externo) têm elementos glicoproteicos ou proteicos, que conectam-se na partícula viral em uma membrana lipídica, como por exemplo: a glicoproteína Spike (S), essa glicoproteína forma projeções em trímeros; a glicoproteína da membrana (M), podendo dizer que está é a mais abundante; a proteína Hemaglutinina Esterase (HE), encontrada somente em alguns Betacoronavírus; e a proteína do Envelope (E), que é altamente hidrofóbica. No interior deste envelope, há um nucleocapsídeo helicoidal formado pela junção da proteína do 12 Nucleocapsídeo (N) com o material genético do vírus (ssRNA+), para proteção do genoma (Cruz et al., 2020).

3.1.3 Replicação do Coronavírus

Primeiramente a replicação dos coronavírus inicia-se na etapa de adsorção, ou seja, quando a região RBD da subunidade S1 da glicoproteína viral S interage com receptores de membrana da célula hospedeira. (Fehr; Perlman, 2015). A originalidade entre a região RBD da glicoproteína S e os receptores celulares variam-se entre as espécies de coronavírus: alguns usam o Receptor Aminopeptidase (APN); já o MERS-CoV, interage com o Receptor Dipeptidil Peptidase (DPP4) celular, enquanto o SARS-CoV e o SARS-CoV-2 ligam-se ao receptor ACE2. A eficácia da ligação entre o vírus e os receptores celulares gera a fragilidade das diferentes espécies de hospedeiro à infecção (refs), assim como define o tropismo viral a nível celular e tecidual. (Hoffmann Et Al., 2020; Hofmann Et Al., 2005; Hulswit; De Haan; Bosch, 2016).

Logo após a adsorção da partícula viral à célula-alvo, acontece a clivagem da glicoproteína S de SARS-CoV-2, dentre as subunidades S1 e S2, por meio da ação de proteases celulares; etapa essa, considera essencial para entrada do vírus na célula. Isso acontece porque, com a proteólise, possui exposição do peptídeo de fusão, que mediará a fusão do envelope viral com a membrana celular. (Heald-Sargent; Gallagher, 2012).

Em seguida, acontece o desnudamento do RNA, nessa etapa, há a liberação do material genético do vírus no citoplasma da célula. (Fehr; Perlman, 2015). Sabendo que o genoma dos coronavírus incide em uma molécula de RNA de polaridade positiva, logo pode ser transcrito pela maquinaria celular, originando-se pelas ORF1a e ORF1b, que coligem para as poliproteínas pp1a e pp1ab. Estas são subsequentemente clivadas em Proteínas Não Estruturais (NSPs), que compreendem proteases e enzimas do complexo replicase-transcriptase, como a RNA-polimerase RNA dependente, o domínio da RNA helicase e a exoribonuclease. (Fehr; Perlman, 2015)

Depois, acontece a montagem dos vírions maduros, por meio da associação da proteína N ao RNA e brotamento do Ergic juntamente com as proteínas estruturais. Em seguida, os vírions são transportados para a superfície celular, onde ocorre a liberação das partículas virais por exocitose. (Fehr; Perlman, 2015)

3.1.4 Processo de Transmissão da Covid-19

A transmissão dessa doença se dá por meio de secreções respiratórias, bem como mediante o contato pessoal com indivíduos ou superfícies contaminadas pelo vírus (Xu et al., 2020), através de gotículas, aerossóis e contato direto com o indivíduo infectado (Rothan E Byrareddy, 2020). O contágio da Covid inclui a sua morfologia própria. Tem em seu envoltório proteínas específicas “spikes”, cujo formam uma espécie de coroa denominando a família dos vírus. Essas proteínas, dividirem-se em S1 e S2 auxiliando a endocitose do vírus quando são ligadas aos receptores celulares específicos como: o receptor da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2), a Aminopeptidase N etc, de forma que há um tropismo maior do vírus para as regiões que possuem esses receptores, por exemplo, os pneumócitos, macrófagos e pulmonares.

Logo após, essa ligação proteases celulares quebram a proteína S, o que ocasiona a fusão do vírus com a célula facilitando assim a entrada do vírus. Com isso, outras proteínas específicas se ligam à célula hospedeira e, assim, agem também no desvio para as organelas de replicação, onde utilizarão a maquinaria celular para promover a replicação do genoma viral. Ademais, considera-se que essas proteínas “N” também podem interferir na sinalização de Interferon via intracelular procedendo na inibição do Sistema Imune Inato do paciente.

No mais, segundo os pesquisadores, o SARS-CoV-2, tem a transmissão respiratória como uma única via confirmada. Aqueles pacientes portadores do vírus que estejam assintomáticos também podem ser uma fonte de transmissão, mesmo que esses pacientes possam ter uma carga viral menor em relação aos que desenvolveram a doença. Esse vírus tem

alta transmissibilidade e, aliado às viagens globais, constatou-se o seu grande potencial para o desenvolvimento da pandemia (Lai et al, 2020).

3.2 Reposicionamento de Fármacos

3.2.1 Processo de Reposicionamento

Apesar de outras linhagens da família Coronaviridae, conhecida como uma família viral circularem por muitos anos pelo mundo, o SARS-CoV-2 foi definido inicialmente como um vírus novo e que obtinha pouco estudo sobre o mesmo. Sabendo disso, e como uma nova terapia pode levar muitos anos, os cientistas optaram por uma estratégia que teria um processo mais rápido, estratégia essa, que seria o reposicionamento de medicamentos que foram aprovados, ou estão em desenvolvimento, para outras condições, o que pode ser beneficiado pelas informações detalhadas sobre a farmacologia e toxicologia humanas já conhecidas e que permitem ensaios clínicos e processos regulatórios mais rápidos (C. HARRISON et al, 2020).

Essa estratégia com o reposicionamento tornou-se popular para o aumento de fármacos nos últimos anos, esse processo já existe para doenças que não tem cura. O processo tradicional é diferente, pois é mais demorado podendo envolver grandes riscos, por isso, requerem altos investimentos, apesar de serem eficientes, são mais econômico e não possuem grandes riscos, oferecendo uma oportunidade para muitos países de desenvolver fármacos com menores custos e mais rapidez, ou seja, esse processo reduz o custo e o tempo de pesquisas para desenvolver algum medicamento.

3.2.2 Processo de Desenvolvimento de Fármacos

Por mais que o processo de reposicionamento esteja sendo uma alternativa positiva e rápida, é importante ressaltar que para o fármaco chegar até à população, não é um processo tão fácil assim, pois são necessárias muitas etapas.

Inicialmente, acontece a fase da pesquisa, onde se faz a descoberta de uma nova molécula ou um novo mecanismo de ação para uma determinada doença. Iniciam-se nesta fase, diversos testes em laboratório (modelos in vitro) para comprovar que a molécula funciona, nessa mesma etapa estuda-se as modificações do composto para ver a melhoria da atividade em busca de uma formulação.

Logo mais, essa molécula será testada primeiramente em animais, e nessa fase é avaliado se o protótipo pode causar algum efeito indesejado e identificar se pode ser tóxico, sabe-se como ele deve ser administrado se será injetado ou comprimido, em qual dose, e

também se sabe como é o comportamento da molécula em um organismo. Feito isso, se tiver comprovação da eficácia e segurança, os testes irão prosseguir em humanos.

Ao testes em humanos acontecem em 3 fases: na primeira fase, são voluntários saudáveis que não possuem doenças em alguma avaliação feita, onde são testados para conferir se o futuro medicamento irá causar qualquer efeito não desejável; na segunda fase, são testados em poucos voluntários, já nessa etapa testarão naqueles que são portadores da doença, onde são estudados para avaliação da segurança e comprovação de que o medicamento funciona, onde verá sua eficácia contra a doença; já na terceira fase, os testes são feitos em número maior de voluntários com a doença.

O reposicionamento de fármacos visa reduzir o custo e tempo desse processo, nesse processo são utilizados fármacos já são reconhecidos e aprovados por agências regulatórias. De tal modo, o medicamento já passou por testes toxicológicos e de segurança. Com isso, várias etapas não precisam mais ser feitas, sendo eliminadas ou encurtadas, conseqüentemente, o tempo para o desenvolvimento se torna muito menor, com foco na nova doença em estudo, esse processo tem sido uma saída para diversas doenças.

Para as doenças que são consideradas negligenciadas, esse processo de reposicionamento é uma extraordinária estratégia, em que pouco se é investido, ou ainda para aquelas doenças emergenciais, como a que estamos vivenciando, a pandemia pelo novo coronavírus. Para os estudos do COVID-19, mais ou menos 12 medicamentos já eram conhecidos e inicialmente foram testados, uma vez que não existe tratamento específico para esse vírus.

Vale ressaltar que por mais que esse procedimento seja promissor, após os testes em laboratório, ainda deverão ser testados em fases clínicas, para saber a eficácia do medicamento e se funcionará em pacientes humanos infectados do vírus, e sobretudo saber que não cause algum efeito inesperado, que possa agravar o quadro de pacientes que já estão sofrendo da doença. O processo desses testes está em andamento em vários centros do mundo, porém é necessário aguardar os resultados para que possam fazer o uso seguro dessa alternativa.

3.3 BIOINFORMÁTICA

3.3.1 Evolução da Bioinformática

A ciência assim como outras áreas estão em constante evolução, ao longo dos anos e o uso de novas técnicas e ferramentas, apesar de serem necessárias as mesmas, tornou-se

extremamente útil para o alcance de resultados que antes dessas ferramentas era mais difícil, e uma dessas ferramentas é a conhecida como a Bioinformática.

Por volta do ano de 1953, foi publicado na revista Nature um artigo que foi de suma importância para a história da ciência mundial. Artigo publicado por James Watson e Francis Crick, onde expunha, pela primeira vez, como é a estrutura da molécula de DNA, uma dupla hélice espiralada. Apesar dessa publicação ter sido reconhecida como um marco científico, ela foi uma virada de chave para a bioinformática, através das ferramentas que foram usadas para a descoberta da estrutura da molécula.

Logo por volta da segunda metade da década de 90, após o aumento dos estudos sobre biologia molecular apareceram ainda mais ferramentas para sequenciar o DNA automaticamente, o que acabava provocando uma enorme base de dados, ainda, havia uma obrigação de algo a mais para realizar as análises desses dados imensuráveis, e nesse contexto surgiu a bioinformática.

A sociedade contemporânea tem se deparado com os impactos ocasionados pelos avanços e descobertas oriundos de projetos de pesquisa conduzidos a fim de decifrar a natureza do material genético em uma grande variedade de organismos procarióticos e eucarióticos, buscando com essas descobertas o conhecimento total ou parcial de suas sequências de DNA. Compreende-se que um genoma armazena inúmeros fragmentos de DNA dispostos em posições específicas, denominados genes, cujas informações coordenam e controlam todos os aspectos da síntese de proteínas que, em última instância, atuam como máquinas moleculares moduladoras da homeostase celular (Alberts B, Bray D, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K et al. 2005.). Por mais que a estrutura do DNA tenha sido descoberta em 1953 pelos ingleses Watson e Crick (Griffith A, Muller JF, Suzuki JH, Lewontin RC, Gelbart WM, Wessler SR et al. 2006), precisou aguardar até meados da década de 1980 para que fosse desenvolvida uma lente que tivesse um aumento suficientemente boa (uma máquina automatizada) que deixasse a leitura em grandes quantidades do código genético contido nas biomoléculas (Setúbal JC et al. 2003). Na parte da computação, precisou-se também um foi também preciso um avanço com a revolução da informática, para a obter computadores capazes e adequados de armazenar cada vez mais informações e de processá-los de modo cada vez mais rápido a uns custos mais reduzidos.

De uma forma mais ampla, uma aplicação diretamente da bioinformática nos estudos de genômica entende-se à assimilação de possíveis diferenças nas sequências gênicas que por sua vez, possam beneficiar o desenvolvimento de ferramentas para a melhoria do diagnóstico de algumas doenças e anomalias. As diferenças que são encontradas nas sequências nucleotídicas

são submetidas a ferramentas estatísticas, que poderão determinar as possibilidades de adoecimento ou não dos indivíduos de uma população, em que cada ser vivo se transforma em informações, dotados de instruções sobre seu próprio processo de funcionamento.

3.3.2 O Uso da Bioinformática para o Coronavírus

Com a evolução da bioinformática e o crescente aumento da mesma nas últimas décadas, a bioinformática, onde se agrupa ao sequenciamento de DNA, vem gerando uma verdadeira revolução em diferentes áreas da medicina. É utilizada essa ferramenta para fazer as análises e sequenciamento do genoma de cada paciente e conseqüentemente determinar o seu perfil genético, procedimento esse, que facilitará e ajudará o médico a prevenir maior ou menor suscetibilidade a certas doenças. Nos últimos anos, a adaptação e os avanços de recursos tecnológicos, sobretudo na área de Ciências da Saúde, vem sendo uma prioridade para suprir determinadas falhas, como requerer a criação de programas analíticos que possam ser capazes de armazenar complexas sequências de genes. Logo, em pouco tempo, a informática vem tornando-se uma peça essencial aos estudos da área biológica, abrindo novas fronteiras para as análises de genômica e proteômica.

Pode-se assegurar que a bioinformática é uma das peças-chave para o sucesso da análise de dados de pesquisas já sucedidas e que ainda irão ser. O crescimento de pesquisas acerca desse tema é estratégico e indispensável para impulsionar significativamente relevantes descobertas científicas nessa área do conhecimento.

Sabendo disso, as análises computacionais de dados já existentes tornam-se um exercício muito relevante para viabilizar a extração de informações pertinentes e concretizar as potencialidades de se possuir o genoma completo ou parcial de um organismo. Dessa forma, há uma relação de motivação científica e tecnológica muito forte entre a descoberta do DNA, estudos de transgenia, materialidade do conhecimento propiciada pela biologia molecular e pela genômica, e o desenvolvimento da bioinformática.

Com isso, por ser usada para as análises de dados genéticos e conseqüentemente ser eficaz em suas buscas e avanços, a bioinformática teve um papel ativo para os estudos contra o novo coronavírus. Com a ajuda dessa tecnologia e das ferramentas de bioinformática, milhares de cientistas do mundo utilizaram a mesma para investigar em curto tempo sobre a evolução viral, podendo rastrear novas variantes e fazendo modelos matemáticos que ajudaram a compreender a evolução da pandemia.

Perante esses anos de pandemia, cientistas e pesquisadores buscavam não apenas conseguir alguma maneira de conter o contágio entre as pessoas, mas também de entender melhor a estrutura do vírus para o desenvolvimento de medicamentos e vacinas. Uma das maneiras para isso, é através do estudo do material genético (genoma) que o vírus tem. Logo, para adquirir esse conhecimento, cientistas vêm executando um grande número de experimentos, tanto dentro, como fora de laboratórios, nos quais inserem desde a extração do material genético (DNA ou RNA) até a utilização de ferramentas de bioinformática que permitam a decodificação de seu material genético. O objetivo desse procedimento é compreender as relações entre os tipos de coronavírus conhecidos, como eles reagem a diferentes ambientes e até mesmo como se dá o processo de mutações.

É utilizado para esses estudos de genoma, um conjunto de ferramentas de bioinformática chamado de pipeline, que significa tubo, em Inglês. Para o estudo deste novo coronavírus (SARS-CoV-2), os cientistas apresentaram um pipeline com vários aplicativos de informática, cujo nome pode ser traduzido como Ferramenta de Detecção e Genotipagem de Coronavírus (do original em Inglês, Genome Detective Coronavirus Typing Tool).

3.4 OS DIURÉTICOS

3.4.1 Identificação dos Fármacos Diuréticos

Por volta do século XIX, começaram as descobertas das propriedades diuréticas de compostos presentes em determinados herbáceos. Por volta de 1884, identificou-se o componente diurético que se faz presente no café, chamada e cafeína. Iniciaram-se as descobertas dos inibidores da anidrase carbônica no ano de 1949, por meio da observação da ação da sulfonilamida, estimulando a procura por outros compostos que poderiam se derivar e resultar na descoberta de diversos novos fármacos. A partir daí, diversos diuréticos foram introduzidos na terapêutica, sendo uma das classes de fármacos que são mais utilizados no tratamento de pacientes hipertensos, esses fármacos são utilizados no tratamento de edemas resultantes de uma variedade de causas, como por exemplo insuficiência cardíaca congestiva, síndrome nefrótica, doenças crônicas do fígado, em associação à hipertensão, hipercalcemia, diabetes, glaucoma etc, (Goodman, L. S.; Gilman, A. et al. 2003). Por serem eficazes e ter um baixo custo para a utilização do mesmo, estão sendo muito utilizados, além disso podem ser usados em associações a outros anti-hipertensivos, aumentando os efeitos.

Os fármacos diuréticos são medicamentos que são utilizados para aumentar a eliminação do sódio (sal) e água por meio da urina, eles reduzem o volume intravascular por um aumento

na excreção renal de sódio e água (Golan De, Tashjian AH, Armstrong EJ, et al. 2009; Brunton LL, Chabner BA. Knollmann BC, et al. 2012). Diante disso, eles agem antes estimulando a excreção de íons sódio (Na^+), cloro (Cl^-) ou bicarbonato (HCO_3^-), que são os principais eletrólitos presentes no fluido extracelular. Esses fármacos são usados para tratar a hipertensão arterial e quadros de edema, ou seja, aqueles acúmulos de água que ocasionam inchaços, são utilizados também para outros fins, com a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), insuficiência renal crônica e glaucoma.

3.4.2 Mecanismo de Ação dos Diuréticos

O mecanismo de ação dos diuréticos, se faz presente na fisiologia renal, onde, inicialmente o néfron é a unidade funcional básica dos rins, que é composto por um glomérulo, túbulos contorcidos proximal e distal, alça de Henle e ducto coletor. A urina tem se forma no glomérulo, onde é ultrafiltrada para ficar livre de substâncias celulares não filtráveis, como por exemplo as hemácias, leucócitos e as proteínas plasmáticas, que formam um fluido praticamente sem proteínas. Fluido este, que passará pelo lúmen do néfron, onde acontece uma série de alterações em sua composição – 98 a 99% da água junto com uma porção de eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-), além da glicose e da ureia sofrem reabsorção no túbulo. Ressaltando então, a eliminação da urina, correspondendo a quase 1,5L /dia.

Com isso, os fármacos diuréticos podem ter sua ação na filtração glomerular, na reabsorção tubular ou na excreção tubular. Embora que os diuréticos apresentem diferenças em relação ao local de ação no néfron e duração de ação, eles apresentam em comum a propriedade de estimular a eliminação dos íons Na^+ pela urina. Logo o Na^+ não é excretado isoladamente, ele carrega a água do sangue, existindo um aumento do volume urinário e conseqüentemente a redução da quantidade de líquido nos vasos sanguíneos, onde reduz a pressão exercida nas paredes das artérias.

3.4.3 Classificação dos Diuréticos

Pode-se dizer que os diuréticos são agregados em diferentes classes e, em uma mesma classe, ressalta-se diferenças entre eles em sua estrutura, em sua farmacodinâmica e na farmacocinética. Os diuréticos podem ser divididos em cinco classes, as quais são: osmóticos, inibidores da anidrase carbônica, de alça, tiazídicos e poupadores de potássio.

Os Diuréticos osmóticos, são aqueles agentes livremente filtrados no glomérulo que sofrem reabsorção restrita pelo túbulo renal e são relativamente inertes do ponto de vista farmacológico. E o principal local de ação é a alça de Henle. Esses diuréticos aumentam a excreção urinária de quase todos os eletrólitos, como Na^+ , K^+ , Ca^+ , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- e fosfato. Os Inibidores da anidrase carbônica, é sítio de ação no túbulo contorcido proximal. Eles inibem a anidrase carbônica renal, e conseqüentemente irá diminuir a reabsorção de bicarbonato de sódio, devido a possibilidade deste diurético ter uma ação anti-hipertensiva independente da diurese, através de mecanismos como a vasodilatação periférica (Vasco RF, Moyses RM, Zatz R, Elias RM, et al.2016).

Os diuréticos de alça, agem no ramo ascendente da alça de Henle. O mecanismo de ação inibe o sistema Co transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$. Esses diuréticos de alça são os diuréticos são considerados um dos mais potentes. Eles são reservados para situações de hipertensão associada à doença renal crônica com taxa de filtração glomerular abaixo de 30.

Os diuréticos caracterizados como tiazídicos e similares (hidroclorotiazida, clortalidona e indapamida) são os diuréticos mais frequentemente usados na prática clínica em monoterapia ou em associação com outros fármacos anti-hipertensivos. Eles reduzem de forma significativa e satisfatória a pressão arterial (PA), quando são utilizados em baixas quantidade de doses, e têm excelente ação quando associados aos inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs), bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRAs) e bloqueadores dos canais de cálcio (BCC).

São caracterizados como diuréticos poupadores de potássio, aqueles que atuam no túbulo distal e ducto coletor. Quando agem nesses locais, sofrem influência da aldosterona (hormônio mineralocorticóide) e do ADH na recuperação de água.o diurético Espironolactona inibe a reabsorção de sódio e água e a eliminação de potássio, por causa do antagonismo competitivo com a aldosterona (na maioria das vezes é usada em associação a um diurético de alça). Logo, a espironolactona bloqueia os receptores mineralocorticóides, inibindo a transcrição de proteínas que ativam canais de Na^+ , aumentando síntese de canais de K^+ , aumentando produção de Na^+/K^+ ATPase e de ATP e, também, aumentando síntese de antitransporte Na^+/H^+ .

3.4.5 Ação dos Diuréticos Analisados

O diurético Amiloride, também chamado de Cloridrato de amilorida é um medicamento aproveitado de potássio que tem uma leve atividade natriurética, diurética e anti-hipertensiva.

A principal função desse medicamento é a conservação do potássio naqueles pacientes que sofrem de perda em excesso de potássio e que recebem agentes diuréticos. A ação do cloridrato de amilorida, na maioria das vezes acontece até duas horas após a administração oral. Seu efeito sobre a excreção de eletrólitos pode atingir no máximo entre 6 e 10 horas e a duração dura cerca de 24 horas. Os níveis plasmáticos máximos são obtidos em 3 a 4 horas e a meia-vida plasmática varia de 6 a 9 horas.

O diurético Bendrolumethiazide pertence à família das tiazida, e sua ação age sobre o mecanismo tubular renal de absorção de eletrólitos. Nesse processo inibe a reabsorção de sódio no nefro distal, aumentando a excreção urinária de sódio e cloreto em níveis quase iguais e também aumenta a excreção urinária de potássio. É muito usado como agente antihipertensivo, sem que o mecanismo de ação tenha sido ainda explicado. A bendroflumetiazida não afeta a pressão arterial normal, contudo diminui os valores elevados. A excreção de bicarbonato é suavemente crescida pela bendroflumetiazida, mas não o suficiente para provocar uma mudança no pH urinário. É um diurético que se absorve com relativa rapidez após sua administração oral. Sua meia-vida normal é de 15 horas, seu efeito começa depois de 2 horas, o efeito máximo é alcançado após 4 horas e sua ação perdura de 6 a 12 horas.

A Bumetanida ou Bumetanide, é um diurético da classe de alça, sua ação inicia-se rapidamente, porém e de curta duração, é um diurético que age inibindo a reabsorção do cloro e sódio na parte ascendente da alça de Henle, evidenciada pela redução do “clearance” de água livre na hidratação e da reabsorção de água livre na hidropenia. É também produzida através da Bumetanida fosfatúria, isso acontece talvez por uma ação no túbulo proximal não relacionada à inibição da anidrase carbônica e, também, diminui a excreção de ácido úrico.

O diurético Chlorthalidone ou Clortalidona, é uma substância ativa de Clortalidona, é quimicamente relacionada às sulfonamidas, logo, é um diurético do grupo das tiazidas com ação demorada. A tiazida e os diuréticos parecidos à tiazida atuam sobretudo na porção proximal do túbulo contornado distal, inibindo a reabsorção de NaCl (antagonizando o cotransporte de Na⁺ e Cl⁻) e requerendo a reabsorção de Ca⁺⁺ (mecanismo desconhecido). O aumento de liberação de Na⁺ e água para o túbulo coletor cortical e, ou o aumento da velocidade do fluxo dirige a um aumento da secreção e excreção de K⁺ e H⁺.

A Espironolactona é um antagonista farmacológico característico da aldosterona, agindo no local de troca de íons sódio-potássio dependente de aldosterona, que se localizam no túbulo contornado distal do rim. A espironolactona ocasiona o aumento das quantidades de sódio e água a serem excretados, à medida que o potássio é retido. Esse fármaco atua como diurético e como anti-hipertensivo, ela pode ser administrada sozinha ou com outros agentes diuréticos que

agem mais perto no túbulo renal. Esse diurético age contra o aldosteronismo secundário induzido pelo volume de depleção e associado com a perda de sódio ocasionado pela terapia diurética. Tem uma eficácia na diminuição da pressão sanguínea sistólica e diastólica em pacientes com hiperaldosteronismo primário. É também efetiva na maioria dos casos de hipertensão essencial apesar do fato da secreção de aldosterona estar dentro dos limites normais no início da hipertensão essencial.

O Furosemide é um diurético anti-hipertensivo sulfonamida (derivado), classificado como um diurético de alço, espoliador de potássio. Ele pode agir como diurético, inibindo a reabsorção de sódio e água nos rins (ramo descendente da alça de Henle), já como antihipertensivo, irá reduzir o volume de líquidos e o débito cardíaco, baixando a pressão. Sua ação pode ter início entre 20 à 60 minutos (oral) e em 5 minutos (intravenosa) tendo uma durabilidade de 6 a 8 horas (oral) e 2 horas (intravenosa). Esse diurético serve na insuficiência cardíaca congestiva, cirrose do fígado, doença renal (edema) e para hipertensão arterial (tratamento adjunto, com outros anti-hipertensivos).

A ação do Indapamide como diurético, irá interferir na reabsorção de sódio nos rins (túbulos distais) alterando a excreção de sódio e água, é um edema (associado à insuficiência cardíaca congestiva); hipertensão arterial. Ele pode agir também como anti-hipertensivo, o mesmo diminuirá a resistência periférica, agindo diretamente nos vasos. A sua ação inicia-se entre 1 a 2 horas, tendo uma durabilidade de até 36 horas, e sua eliminação ocorre através da urina (não metabolizado).

A metolazona ou metolazone é um diurético da classe dos tiazídicos, são comercializados geralmente sob as marcas Zytanix, Metoz, Zaroxolyn e Mykrox. Esse diurético é utilizado sobretudo para tratar a insuficiência cardíaca congestiva e a hipertensão. Para aquelas pessoas que sofrem com gota ou artrite gotosa, a Metolazona pode aumentar a quantidade de ácido em seu corpo, isso pode ocasionar ataques gotosos. Já para pessoas com problemas renais, a Metolazona é eliminada do seu corpo por meio dos seus rins e pode crescer em seu corpo se os seus rins não estão funcionando tão bem quanto deveriam. Isso pode levar à toxicidade.

O diurético Torsemide ou torasemida é um diurético da ansa da classe piridina-3sulfonilureia, também designados por diuréticos de alto teto. Tem uma estrutura química entre os diuréticos da ansa (como a furosemida) e os bloqueadores dos canais de Cl^- .

O Triantereno ou trianterenine é uma pteridina que é utilizado como um diurético suave. Esses diuréticos são usados só ou em combinação com outros medicamentos para tratar a pressão arterial elevada (hipertensão). A pressão arterial elevada aumenta a carga de trabalho

do coração e artérias. quando a pressão arterial está elevada, ela aumenta a carga de trabalho do coração e artérias. Portanto, se continuar por um longo tempo, o coração e as artérias podem não funcionar corretamente, podendo danificar os vasos sanguíneos do cérebro, coração, rins e, procedendo num acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca ou insuficiência renal. Logo, se a pressão arterial estiver controlada, esses problemas podem ser menos prováveis de ocorrer, ou seja, poderão ser evitados se a pressão arterial estiver controlada. O diurético triantereno é também usado para tratar a retenção de água (edema) em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática, doença renal ou uma chamada síndrome nefrótica.

4. METODOLOGIA

4.1 Prospecção de fármacos diuréticos

Para a realização da pesquisa foram feitas buscas em bancos de dados de produções científicas sobre os diuréticos em bases de dados nacionais e internacionais: Scientific Electronic Library Online (Scielo), Portal Regional da Biblioteca Virtual em Saúde (Bireme), Nacional Center for Biotechnology information (PubMed), Thomson Reuters (Web of Science), Elsevier group (Scopus), (Science Direct) e Google acadêmico. Selecionou-se diuréticos, comumente utilizados na atividade medicinal compreendendo as classes das tiazidas, potássio e cíclicos e anticoagulantes. As estruturas químicas desses compostos foram adquiridas nas bases do PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.2 Docagem molecular

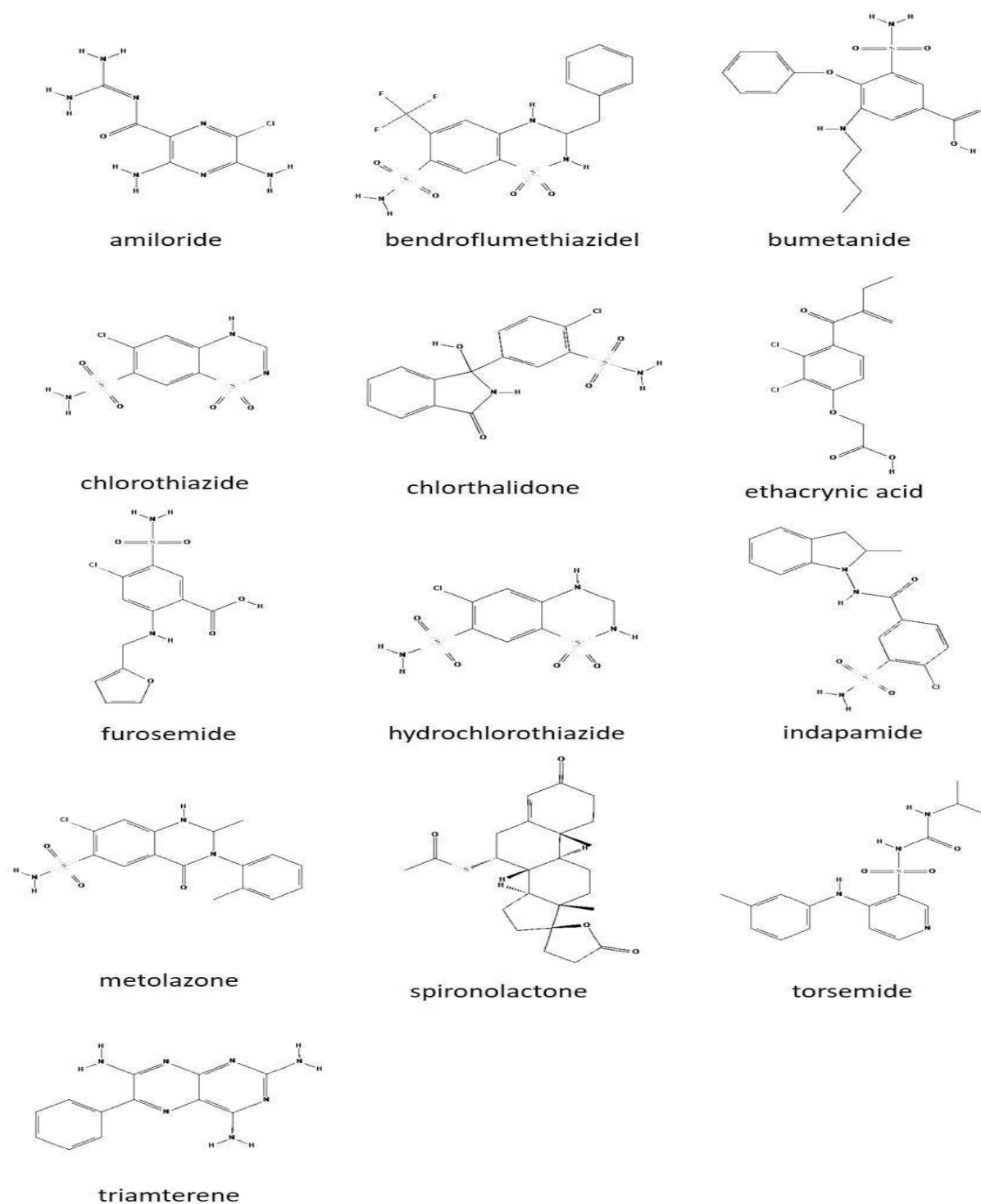
As estruturas em 3D dos alvos de coronavírus foram obtidos no banco de dados de proteínas do Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/>) (Berman et al., 2000), com o respectivo código da proteína S (spike) do novo coronavírus (6VXX) spike aberta e (6VYB) spike fechada, (1R42 – enzima conversora da angiotensina (ECA2)), (6LU7 – proteína principal (mPRO)), (receptor3 – sítio de interação Spike/ECA). As docagens foram realizadas utilizando o programa Autodock Tools (ADT) (<http://autodock.scripps.edu/>), versão 1.5.6 (Goodsell; Morris, 1996; Goodsell, 2005; Morris et al., 2008) e foram realizadas também usando o programa AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>) (Trott & Olson, 2009). Em seguida, os arquivos de proteínas foram preparados pela remoção de todas as moléculas de água e outros grupos, como íons, usando o software Chimera v.13.1 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (Pettersen et al., 2004). O receptor foi considerado rígido, enquanto que cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais Gasteiger (Gasteiger & Marsili, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Os átomos de

hidrogênio não polares de proteínas e ligantes foram subsequentemente mesclados. Foi gerada uma caixa cúbica de 60 x 60 x 60 pontos com resolução de 0,35 Å entre os pontos da grade para todo o alvo da proteína. Os centros das grades de afinidade molecular foram definidos a partir das coordenadas dos átomos dos resíduos. O algoritmo genético lamarckiano (AGL) com busca global (Morris et al., 1998) e pseudo-Solis e Wets com busca local (Solis, 1981) foram os métodos utilizados na docagem molecular. Cada simulação consistiu de 100 corridas independentes (Ramos et al., 2012). O restante dos parâmetros da docagem molecular foram definidos com os valores padrões. As análises foram concentradas nos grupos de menor energia. A conformação de menor energia combinada com inspeção visual foi a escolhida para uma análise mais detalhada (Rocha et al., 2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a busca em bases de dados científicos, foram selecionados um total de 13 diuréticos que são amplamente utilizados na medicina moderna (Figura 01).

Figura 01: Estrutura química bidimensional dos diuréticos selecionados mais utilizados na literatura com aplicações medicinais.



Fonte: Autoria própria

De início foram analisados 12 fármacos diuréticos com a proteína spike do covid-19, esses procedimentos foram realizados através do programa Autodock Tools (ADT) (<http://autodock.scripps.edu/>), versão 1.5.6. evidenciados nas tabelas 01 a 03. E o programa Autodock VINA na tabela 04.

A afinidade molecular do Amiloride com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -3.51 kcal/mol e constante de inibição de 2.68 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Ala397(A), Glu340(A) e Arg346(A) e por ligação hidrofóbica com seis aminoácidos (Tabela 01).

A afinidade molecular do Bendrolumethiazide com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -5.73 kcal/mol e constante de inibição de 63.16 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Glu340(A), Asn354(A) e Arg355(A) e por ligação hidrofóbica com seis (Tabela 01). A afinidade molecular do Bumetanide com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -4.96 kcal/mol e constante de inibição de 231.08 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Ala397(A), Asn354(A), Ala348(A) e Lys356(A) e por ligação hidrofóbica com seis aminoácidos, todos na cadeia A (Tabela 01).

A afinidade molecular do Chlorthalidone com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -5.94 kcal/mol e constante de inibição de 44.13 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Arg346(A), Asn354(A), Lys356(A) e Glu340(A) e por ligação hidrofóbica com quatro aminoácidos (Tabela 01). Já a Chorthalizide apresentou valor de -5.86 kcal/mol e constante de inibição de 50.3 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Ser399(A), Asn354(A) e Arg346(A). e por ligação hidrofóbica quatro aminoácidos, na cadeia A (Tabela 01).

A afinidade molecular do Spirolactone com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -6.27 kcal/mol e constante de inibição de 25.22 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com o aminoácido Asn354(A) e por ligação hidrofóbica com sete aminoácidos (Tabela 01). A Ethacrynic acid apresentou valor de -5.32 kcal/mol e constante de inibição de 131.82 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com o aminoácido Asn354(A) e por ligação hidrofóbica com oito na cadeia A (Tabela 01). A afinidade molecular do Furosemida com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -5.29 kcal/mol e constante de inibição de 125.7 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Arg346(A), Asn354(A) e Lys356(A) e por ligação hidrofóbica com cinco aminoácidos (Tabela 01).

A afinidade molecular do Indapamide com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -5.34 kcal/mol e constante de inibição de 122.75 uM, interagindo por ponte de

hidrogênio com o aminoácido Arg357(A) e por ligação hidrofóbica cinco aminoácidos (Tabela 01).

A afinidade molecular do Metolazone com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -7.37 kcal.mol e constante de inibição de 3.98 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Asn343(A) e Ser373(A) e por ligação hidrofóbica com oito aminoácidos (Tabela 01). O Torsemide apresentou valor de -5.03 kcal/mol e constante de inibição de 204.0 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Arg346(A) e Ser399(A) e por ligação hidrofóbica Val341(A), Glu340(A), Lys356(A), Asn354(A), Arg355(A) (Tabela 01).

Por fim, a afinidade molecular do Triamterene com a proteína spike do covid-19 apresentou valor de -3.16 kcal/mol e constante de inibição de 4.83 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Val341 e Glu340 e por ligação hidrofóbica Asn354, Ser399, Ala397, Ala344, Lys356 (Tabela 01).

Tabela 01: Parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína spike aberta (6VXX) do novo coronavírus COVID-19

Diuréticos	ΔG_{bind}^a (kcal/mol)	K_i^b (uM)	Aminoácidos que interagiram por ponte de hidrogênio ^c	Aminoácidos que interagiram por ligação hidrofóbica ^c
Amiloride	- 3.51	2.68	Ala397(A); Arg346(A); Glu340(A).	Ala344(A); Arg355(A); Asn354(A); Lys356(A); Ser399(A); Val341(A).
Bendrolumethiazide	-5.73	63.16	Arg355(A); Asn354(A); Glu340(A).	Ala344(A); Ala 397 (A); Arg346(A); Lys 356 (A); Ser399(A); Val341(A).
Bumetanide	-4.96	231.08	Ala397(A); Ala348(A); Asn354(A); Lys356 (A).	Ala348 (A); Arg355(A); Arg346(A); Glu340(A); Phe347(A); Ser399(A).
Chlorthalidone	-5.94	44.13	Arg346(A); Asn354(A); Glu340(A); Lys356(A).	Ala344(A); Phe447(A); Ser399(A); Val341(A);
Chorthalizide	-5.86	50.3	Arg346(A); Asn354(A); Ser399(A).	Ala344(A); Glu340(A); Lys356(A); Phe347(A).
Espiro lactona	-6.27	25.22	Asn354(A)	Ala344(A); Ala397(A); Arg346(A); Glu340(A); Lys356(A); Ser399(A); Val341(A).
Ethacrynic acid	-5.29	131.82	Asn354(A)	Ala344(A); Ala397(A); Arg355(A); Arg357(A); Glu340(A); Lys356(A); Ser399(A); Val341(A).
Furosemide	-5.32	125.7	Arg346(A); Asn354(A); Lys356(A).	Ala344(A); Glu340(A); Phe347(A); Ser399(A); Val341(A).
Indapamide	-5.34	122.75	Arg357(A)	Ala397(A); Arg355(A); Asn345(A); Lys356(A); Ser399(A).

Metolazone	-7.37	3.98	Asn343(A); Ser373(A).	Cys336(A); Gly339(A); Leu368(A); Phe338(A); Phe342(A); Phe374(A); Trp436(A); Val367(A).
Torseimide	-5.03	204.0	Arg346(A); Ser399(A)	Arg355(A); Asn354(A); Glu340(A); Lys356(A); Val341(A).
Triamterene	-3.16	4.83	Glu340(A); Val341(A).	Ala397(A); Ala344(A); Asn354(A); Lys356(A); Ser399(A).

^a Energia na melhor conformação; ^b Constante de inibição na melhor conformação; ^c obtido com o Ligplot+ software

Posteriormente foram analisados 08 fármacos diuréticos com a proteína Spike fechada (6VYB) no sítio ativo 01(SA01) do novo coronavírus covid-19, onde foram obtidos os seguintes resultados na tabela 02.

A afinidade molecular do Amiloride com a proteína Spike fechada SA01 do novo coronavírus apresentou o valor de -4.51 kcal/mol e constante de inibição de 498.35 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Phe515, Ser514, Thr430, Asp428 Glu340 e por ligação hidrofóbica três aminoácidos (tabela 02). O Bendroflumethiazide apresentou o valor de -6.21 kcal/mol e constante de inibição de 28.05uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Thr430 e Ser514 e por ligação hidrofóbica com oito aminoácidos (tabela 02).

O Bumetanide com a proteína spike fechada SA01 do novo coronavírus apresentou o valor de -6.23 kcal/mol e constante de inibição de 27.19 uM, não fez interações por ponte de hidrogênio, mas interagiu por ligação hidrofóbica com dez (tabela 02). O Chlorothiazide apresentou o valor de -6.42 kcal/mol e constante de inibição de 19.74 uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Ser514, Phe515, Asp428 e por ligação hidrofóbica com seis aminoácidos (tabela 02).

A interação do Chlorthalidone com a proteína spike fechada SA01 apresentou o valor de -6.8 kcal/mol e constante de inibição de 10.36uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Phe515, Leu517, Ser514 e por ligação hidrofóbica com seis aminoácidos (tabela 02). O Furosemide apresentou o valor de -6.3 kcal/mol de energia de ligação e constante de inibição de 24.21uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Arg355, Tyr200 e com seis aminoácidos por ligação hidrofóbica (tabela 02).

A afinidade molecular do Hidrochorothiazide com a proteína spike fechada SA01 do novo coronavírus apresentou energia de ligação de -6.33 kcal/mol e constante de inibição de 23.48uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Ser514, Thr430, Leu517 e por ligação hidrofóbica com cinco aminoácidos (tabela 02). Já a afinidade molecular do

Torsemide com a proteína spike fechada SA01 apresentou o valor de -7.25 kcal/mol de energia de ligação e constante de inibição de 4.85uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Ser514, Phe515 e por ligação hidrofóbica com onze aminoácidos (tabela 02).

Tabela 02: Parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína Spike fechada (6VYB) no sítio ativo 01 (SA01) do novo coronavírus COVID-19.

Diuréticos	ΔG_{bind}^a (kcal/mol)	K_i^b (uM)	Aminoácidos que interagiram por ponte de hidrogênio ^c	Aminoácidos que interagiram por ligação hidrofóbica ^c
Amiloride	-4.51	498.3 5	Asp428(A); Phe515(A); Ser514(A); Thr430(A)	Phe464(A); Phe429(A); Pro426(A).
Bendroflumethiazide	-6.21	28.05	Ser514(A); Thr430(A).	Asp428(A); Glu516(A); Leu517(A); Phe429(A); Phe464(A) Phe515(A); Pro426(A); Tyr396(A).
Bumetanide	-6.23	27.19	-	Asp428(A); Glu516(A); Leu517(A); Phe429(A); Phe464(A); Phe515(A); Pro426(A); Ser514(A); Thr430(A); Tyr396(A).
Chlorothiazide	-6.42	19.74	Asp428(A); Phe515(A); Ser514(A).	Glu516(A); Phe429(A); Phe464(A); Pro426(A); Thr430(A); Tyr396(A).
Chlorthalidone	-6.8	10.36	Leu517(A); Phe515(A); Ser514(A).	Asn394(A); Glu516(A); Phe464(A); Thr430(A); Tyr200(A); Tyr396(A).
Furosemide	-6.3	24.21	Arg355(A); Tyr200(A).	Phe464(A); Tyr396(A); Ser514(A); Glu516(A); Asn196(A); Lis202(A).
Hidrochorothiazide	-6.32	23.48	Ser514(A); Thr430(A); Leu517(A).	Asp428(A); Phe429(A); Phe464(A); Phe515(A); Pro426(A).
Torsemide	-7.25	4.85	Phe515(A); Ser514(A).	Asn394(A); Asp428(A); Glu516(A); Leu518(A); Leu517(A); Phe429(A); Phe464(A); Pro426(A); Thr430(A); Tyr200(A); Tyr396(A).

^a Energia na melhor conformação; ^b Constante de inibição na melhor conformação; ^c obtido com o Ligplot+ software

Na sequência foram analisados 04 fármacos diuréticos também com a proteína spike fechada 6VYB, mas no sítio ativo 02 (SA02) do novo coronavírus covid-19, onde foram obtidos os seguintes resultados (tabela 03).

A afinidade molecular do Amiloride com a proteína spike fechada SA02 do novo coronavírus covid-19 apresentou o valor de -4.88 kcal/mol de energia de ligação e constante de inibição de 264.92uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Phe377, Cys379, Gly 413, Asp985 e por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Lys378, Pro987,

Pro384, Glu988, Ser383 (tabela 03). O Bendroflumethiazide apresentou o valor de -6.18 kcal/mol e constante de inibição de 29.72uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Thr430, Ser514 e por ligação hidrofóbica com oito aminoácidos (tabela 03).

O Bumetanide com a proteína spike fechada SA02 apresentou o valor de -5.77 kcal/mol e constante de inibição de 58.55uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Cys379, Arg408, Thr376, Phe377 e por ligação hidrofóbica com cinco aminoácidos (tabela 03). E o Chlorothiazide apresentou energia de ligação no valor de -6.6 kcal/mol e constante de inibição de 14.58uM, interagindo por ponte de hidrogênio com os aminoácidos Gln414, Arg408, Thr415, Cys379, Ser38 e por ligação hidrofóbica com os aminoácidos Glu988, Pro384, Val 382 (tabela 03).

Tabela 03: Parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína spike fechada (6VYB) no sítio ativo 02 (SA02) do novo coronavírus COVID-19.

Diuréticos	ΔG_{bind}^a (kcal/mo)	K_i^b (uM)	Aminoácidos que interagiram por ponte de hidrogênio ^c	Aminoácidos que interagiram por ligação hidrofóbica ^c
Amiloride	-4.88	264.9 2	Asp985(A); Cys379(A); Phe377(A); Gly 413(A).	Glu988(A); Lys378(A); Pro384(A) Pro987(A); Ser383(A).
Bendroflumethiazide	-6.18	29.72	Ser514(A); Thr430(A).	Asp428(A); Glu516(A); Leu517(A); Phe429(A); Phe464(A); Phe515(A); Pro426(A); Tyr396(A).
Bumetanide	-5.77	58.55	Arg408(A); Cys379(A); Phe377(A); Thr376(A).	Gln413(A); Gly414(A); Glu988(A); Lys378(A); Pro384(A).
Chlorothiazide	-6.6	14.56	Arg408(A); Cys379(A); Gln414(A); Ser383(A); Thr415(A).	Glu988(A); Pro384(A); Val382(A).

^a Energia na melhor conformação; ^b Constante de inibição na melhor conformação; ^c obtido com o Ligplot+ software

Foram analisados 13 fármacos diuréticos com as proteínas Spike (S), ECA2, complexo ECA2/Spike e proteína mPRO do novo conoravírus, que estão representadas na Tabela 04, esses procedimentos foram realizados através do programa Autodock Tools VINA.

A partir dos resultados, observou-se que o diurético Espirolactona obteve a maior afinidade com a proteína Spike em relação aos outros compostos analisados, apresentando energia de ligação no valor de -8.1kcal/mol. como observa-se na tabela 04 abaixo.

Com a proteína ECA2, nota-se que o diurético Bendrolumethiazide apresentou maior afinidade molecular, com energia de ligação igual a -7.0 kcal/mol, após as análises dos

parâmetros de afinidade molecular dos diuréticos com a proteína ECA2 do novo coronavírus COVID-19 obtidos na terceira coluna.

Testou-se também a afinidade molecular dos diuréticos selecionados com o complexo das proteínas ECA2/Spike e por meio dos resultados obtidos percebe-se que o diurético Chlorthalidone destacou-se como o ligante de maior afinidade molecular com as proteínas, revelando um valor de -7.1 kcal/mol de energia de ligação

Além disso, observa-se também que a partir da interação dos diuréticos com a proteína mPRO do vírus, o Espirolactona, destacou-se mais uma vez como o ligante de maior afinidade, apresentando energia de ligação no valor de -7.4 kcal/mol.

Tabela 04: Parâmetros de afinidade molecular pelo método vina em ΔG_{bind} (kcal/mol) entre os diuréticos com a proteína S, proteína ECA2, complexo ECA2/S e proteína mPRO do novo coronavírus Covid-19.

Diuréticos	Proteína Spike	Proteína ECA2	Complexo ECA2/Spike	Proteína mPRO
Amiloride	-7.0	-5.4	-6.2	-5.7
Bendrolumethiazide	-7.9	-7.0	-6.9	-7.0
Bumetanide	-6.1	-5.5	-6.3	-6.6
Chlorthalidone	-7.4	-6.2	-7.1	-6.7
Chorthalizide	-6.5	-6.8	-5.9	-6.1
Espirolactona	-8.1	-6.8	-7.0	-7.4
Ethacrynic acid	-6.2	-5.6	-5.9	-5.8
Furosemide	-6.8	-6.3	-6.7	-7.1
Hydrochlorothiazide	-6.3	-5.9	-6.2	-6.3
Indapamide	-7.5	-6.7	-6.7	-7.1
Metolazone	-7.2	-6.7	-6.8	-6.8
Torseamide	-7.1	-6.2	-7.0	-7.1
Triamterene	-6.6	-6.2	-7.0	-6.6

Um dos métodos que está sendo utilizado atualmente e que está tornando-se mais rápidos para a identificação de drogas potentes para COVID-19 tem sido o reposicionamento de drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA), visando enzimas essenciais para o ciclo de vida do SARS-CoV-2 e sua replicação (Zhou et al., 2020). Vale ressaltar que o uso de reposicionamento de medicamentos diminui o custo da produção, reduz o tempo e também diminui o risco de falha, sendo crucial no atual cenário (Pushpakom et al., 2019; Sharp; Dange, 2020), método esse que fora utilizado para a realização deste trabalho.

Segundo Ernst (et al.,2010) os diuréticos mais vulgarmente utilizados na prática clínica são as tiazidas e seus análogos (hidroclorotiazida, Chlorthalidone e Indapamida), os diuréticos de ansa (Furosemida) e os poupadores de potássio (Espironolactona, Amilorida e Triantereno). Após análises e a obtenção dos resultados, observou-se que os diuréticos Espironolactona, Bendrolumethiazide e Chlorthalidone destacaram-se ao serem analisados com as proteínas Spike, ECA2, ECA2/Spike e com a proteína mPRO do vírus, destacando-se mais de uma vez o diurético Espironolactona que obteve maior afinidade molecular, com uma energia de ligação significativa em duas proteínas analisadas. Alguns colaboradores explicam que a proteína Spike tem duas subunidades funcionais, S1 e S2 e é utilizada para entrar na célula, a partir de sua ligação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), presente na membrana celular de alguns órgãos do hospedeiro (Shibata et al., 2020). Por essa razão, a proteína spike tem sido alvo de muitos estudos em todo o mundo, buscando formas de neutralizar a infecção por SARSCoV-2, impedindo sua entrada na célula (Souza et al., 2020; Walls et al., 2020).

Nos resultados obtidos o diurético Espironolactona teve a maior afinidade com a proteína Spike e com a proteína mPRO do vírus, segundo Germed (et al., 2015) a Espironolactona é indicado na prevenção da hipopotassemia (diminuição dos níveis sanguíneos de potássio) e hipomagnesemia (diminuição dos níveis sanguíneos de magnésio) em pacientes tomando diuréticos, indicada para o diagnóstico e tratamento do hiperaldosteronismo primário (aumento dos níveis sanguíneos de aldosterona – hormônio renal – sem causa aparente) e tratamento pré-operatório de pacientes com hiperaldosteronismo primário.

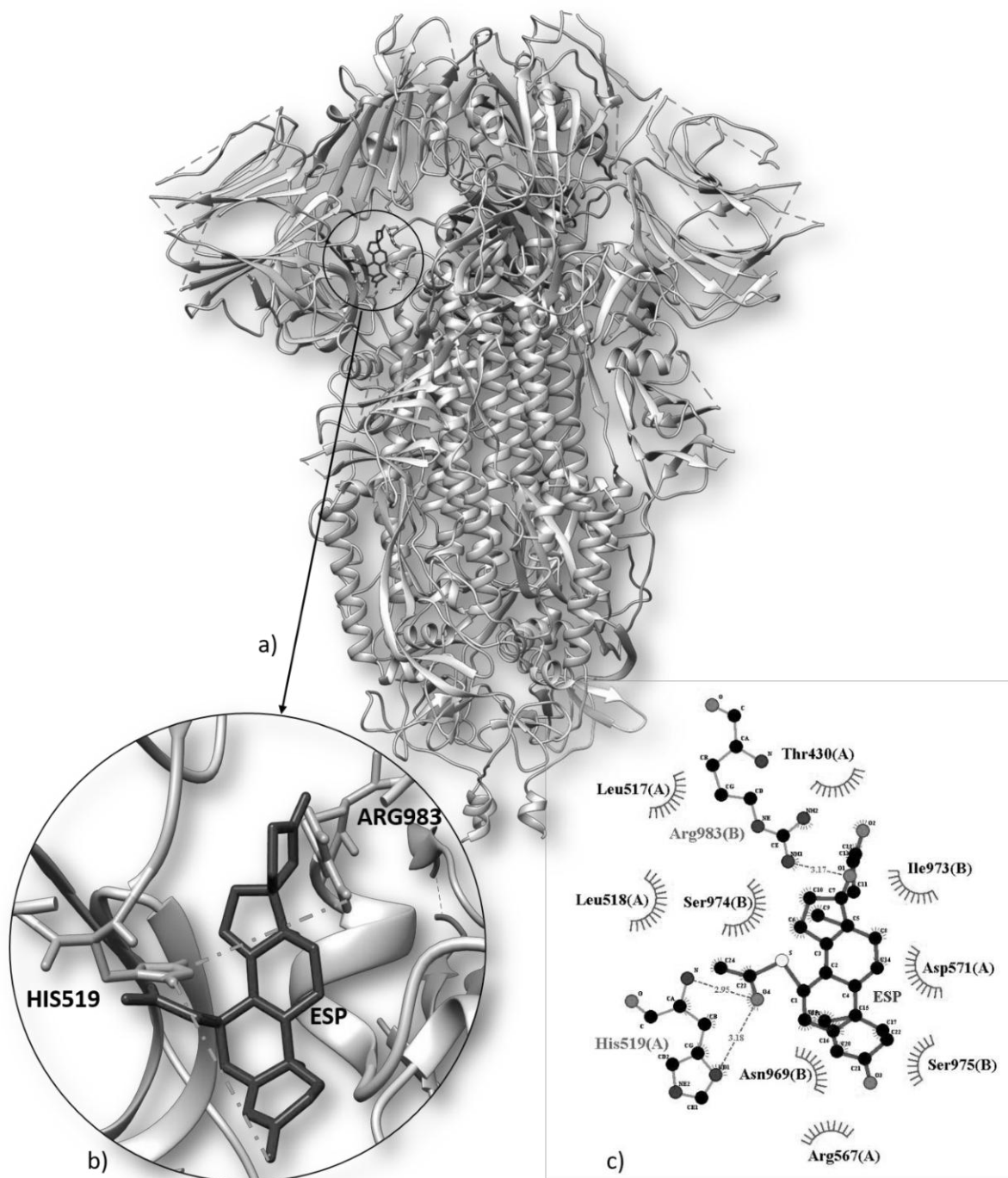
Os estudos sobre o papel fisiológico da ECA2 começaram por volta da década de 40 com Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949). Até este momento só havia evidências sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA), um componente chave do sistema renina-angiotensina (RAS), atuando na clivagem da angiotensina I em angiotensina II (Skeggs Jr; Kahn; Shumway, 1956; Nicolau; Magalhães; Vale, 2020). Alguns anos se passaram, foram feitas novas pesquisas com novos pesquisadores e conseqüentemente novas teorias sobre a mesma surgiram, onde ressaltaram que homóloga da enzima conversora da angiotensina seria responsável pela inativação da angiotensina II pela liberação de fenilalanina, diferindo da ECA no que diz respeito a clivagem de aminoácidos nas angiotensinas (Lentz et al., 1956; Tipnis et al., 2000; Donoghue et al., 2000; Nicolau; Magalhães; Vale, 2020). Ao analisarmos com a proteína ECA2, destacou-se que o diurético Bendrolumethiazide apresentou maior afinidade molecular, o mesmo é um diurético da família das tiazidas e como tal age sobre o mecanismo tubular renal de absorção de eletrólitos. Inibe a reabsorção de sódio no nefro distal, aumenta a excreção urinária de sódio e cloreto em níveis aproximadamente iguais e também aumenta a excreção

urinária de potássio. É usado como agente anti-hipertensivo, sem que o mecanismo de ação tenha sido ainda explicado. A bendroflumetiazida não afeta a pressão arterial normal, mas diminui os valores elevados.

Testou-se também a afinidade molecular dos diuréticos selecionados com o complexo das proteínas ECA2/Spike e por meio dos resultados obtidos, percebe-se que o diurético Chlorthalidone destacou-se como o ligante de maior afinidade molecular com as proteínas, revelando um valor de -7.1 kcal/mol de energia de ligação, segundo a outros estudos, após testarem o diurético Chlorthalidone com outro diurético, o mesmo mostrou-se mais eficaz na prevenção de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e na prevenção do infarto agudo do miocárdio fatal.

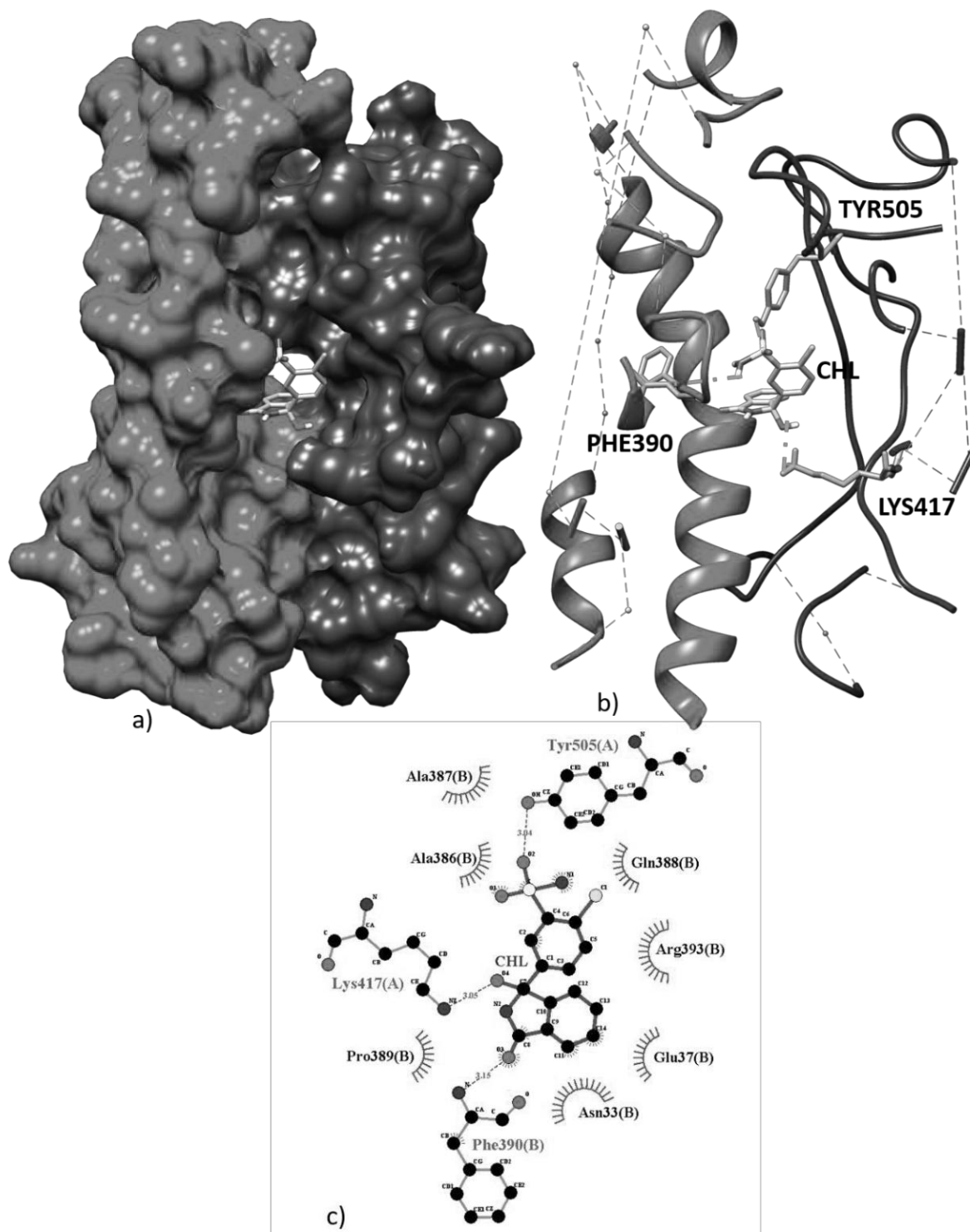
Logo abaixo, na figura 02, destaca-se a Interação molecular do fármaco diurético Espirolactona (azul) com a proteína spike (bege) onde o mesmo apresentou melhores resultados com as proteínas analisadas. Ao lado, a) sítio ativo do acoplamento ligante-proteína em 3d, b) local da interação da espirolacotona com os aminoácidos em 3d e c) interações hidrofóbicas e por ponte de hidrogênio da espirolacotona em 2d. Posteriormente, na figura 03, ressalta a Interação molecular do fármaco Chlorthalidone com as proteínas spike (azul) e ECA (vermelho). a) sítio ativo do acoplamento ligante-proteína em 3d, b) local da interação do Chlorthalidone com os aminoácidos (laranja) em 3d e c) interações hidrofóbicas e por ponte de hidrogênio do Chlorthalidone em 2d.

Figura 02: Interação molecular do fármaco diurético Espirolactona (azul) com a proteína spike (bege). a) sítio ativo do acoplamento ligante-proteína em 3d, b) local da interação da espirolactona com os aminoácidos em 3d e c) interações hidrofóbicas e por ponte de hidrogênio da espirolactona em 2d.



Fonte: Autoria própria

Figura 03: Interação molecular do fármaco Chlorthalidone com as proteínas spike (azul) e ECA (vermelho). a) sítio ativo do acoplamento ligante-proteína em 3d, b) local da interação do Chlorthalidone com os aminoácidos (laranja) em 3d e c) interações hidrofóbicas e por ponte de hidrogênio do Chlorthalidone em 2d.



Fonte: Autoria própria

6. CONCLUSÃO

A pandemia ocasionada pelo novo coronavírus (COVID-19) afetou o mundo todo, conseqüentemente, trouxe efeitos gravíssimos em todos os países e para a população. O rápido aumento do número de pacientes infectados em todo o mundo fez a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar um estado de emergência de saúde global para coordenar os esforços científicos e médicos e desenvolver rapidamente uma cura para os pacientes (TON et al., 2020).

Apesar de usarem alguns agentes antivirais específicos aprovados, os mesmos, não produzem uma cura completa. Pensando nisso, a busca por um fármaco que contribua positivamente para ajudar no combate do novo coronavírus está sendo alvo de muitas pesquisas. Assim, a presente pesquisa trouxe a testes a interação molecular entre fármacos diuréticos e as proteínas selecionadas no banco de dados do novo coronavírus.

A partir dos resultados obtidos diante deste trabalho conclui-se que os diuréticos Metolazone, Torsemide, Chlorthalidone, Bendroflumethiazide e Espirolactona apresentaram maiores afinidades com as proteínas selecionadas, apresentando valores de energia de ligação abaixo de -7.0 kcal/mol, o que está de acordo com os objetivos desta pesquisa, após compará-los com trabalhos anteriores e observa-se resultados satisfatórios e eficazes ao serem utilizado para outros fins, espera-se que após uma análise mais detalhada com os diuréticos selecionados, os resultados futuros possam ser ainda melhores que os anteriores.

Portanto, o reposicionamento dos diuréticos analisados pode ser uma alternativa para o tratamento da Covid-19, pois a afinidade molecular dos fármacos diuréticos com as proteínas do vírus obteve resultados satisfatórios. Após os resultados obtidos com estudos *in vitro* com as proteínas, as respectivas futuras são que os diuréticos que obtiveram melhores resultados possam ser estudados e analisados de uma forma mais detalhada em ensaios clínicos.

7. REFERÊNCIA

Araújo, K. S.; Sousa S. F.; Sousa A. A. A.; Silva J. S.; Rocha J. A. Prospecção científica e tecnológica da dengue no Brasil e no Maranhão no período de 1994 a 2014. **Caderno de Prospecção**, v. 9, n. 3, p. 337-346. 2016.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (2005) *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre. Editor Artes Médicas Sul Ltda, 4a ed.

Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**. v.28, p. 235-242, 2000.

Biologia molecular da célula. 4ª ed. B Alberts, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter. 2002. Nova York: Garland Science. 44. (capa dura). 1616 pp.

Brunton LL, Chabner BA. Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

Chan CY, Peterson EJ, Ng TM. Thiazide diuretics as chronic antihypertensive therapy in patients with severe renal disease--is there a role in the absence of diuresis? *Ann Pharmacother*. 2012;46(11):1554-8

Cui, J.; Li, F.; Shi, Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 181–192, 2019.

De Wilde AH, Falzarano D, Zevenhoven-Dobbe JC, Beugeling C, Fett C, Martellaro C, Posthuma CC, Feldmann H, Perlman S, Snijder EJ (2017) Alisporivir inibe a replicação de MERS e SARS-coronavírus em cultura de células, mas não Infecção por SARS-coronavírus em um modelo de camundongo. *Vírus Res* 228:7–13.

Espironolactona disponível em: [Espironolactona \(comprimido\) - Minha Vida](#) acesso em: 04/05/22.

Fehr AR, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol Biol* 2015; 1282:1-23.

Fung, T. S., LIU, D. X. Human coronavírus: host-pathogen interaction. *Annual Review of Microbiology*, v. 73, p. 529-557, 2019. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-micro-020518-115759>. Acesso em: 28/12/2021.

Fehr, A. R.; Perlman, S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: Coronaviruses. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 1-23.

Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.

Gateiger, J. **The central role of chemo informtics**. Chemometric and Intelligent Laboratory Systems, v. 82, n. 1-2, 200-209, 2006.

Goodsell D. S. Acoplamento computacional de complexos biomoleculares com o AutoDock. Em: Golemis E. A., Adams P. D., editores. Interações proteína-proteína: um manual de clonagem molecular. 2ª ed. Nova Iorque: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 2005.

Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. **Journal of Molecular Recognition**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 1996.

Goodman, L. S.; Gilman, A.; As bases farmacológicas da terapêutica, 10ª ed., Guanabara Koogan : Rio de Janeiro, 2003. 2. Belal, F.; Ibrahim, F.; El Brashy, A.; Analyst 1988.

Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

Harrison C. Coronavirus Puts Drug Repurposing on the Fast Track. *Nat Biotechnol* 2020; 38:379-81.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020;181:271–80.e8.

Hui, D.S.; E, I. A.; Madani, T. A.; Ntoumi, F.; Kock, R.; Dar, O.; Ippolito, G.; McHugh, T. D.; Memish, Z. A.; Drosten, C.; Zumla, A.; Petersen, E. The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *Int. Journal Infect Diseases*, v. 91, p. 264–266, 2020.

ICTV. Virus Taxonomy: 2019, Release. EC 51, Berlin, Germany, July 2019; Email ratification March 2020 (MSL #35); 2019. Disponível em:

https://talk.ictvonline.org/ictvreports/ictv_9th_report/positive-sense-rnaviruses
2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae.

Acesso em: 28 abril. 2022.

- Lentz, Kenneth E. et al. The amino acid composition of hypertensin II and its biochemical relationship to hypertensin I. *The Journal of experimental medicine*, v. 104, n. 2, p. 183-191, 1956.
- Liu, X.; Wang, X. Potential inhibitors for 2019-nCoV coronavirus M protease from clinically approved medicines. **bioRxiv**, 2020.
- Lu, H.; Stratton, C. W.; Tang, Y. W. Outbreak of Pneumonia of Unknown Etiology in Wuhan China: the Mystery and the Miracle. **Journal of Medical Virology**, 2020.
- Morris, G. M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.
- Morris, G. M.; Huey, R.; Olson, A. J. Using autodock for ligand-receptor docking. **Current protocols in bioinformatics**, v. 24, n. 1, p. 8.14. 1-8.14. 40, 2008.
- Negri, E. M; et al. Heparin therapy improving hypoxia in COVID-19 patients - a case series. **medRxiv**, 2020.04.15.20067017.
- Oprea, T. I. **Chemo informatics and the quest for Leads in Drug Discovery**. In: Gateiger, J. (Ed). Handbook of Chemo informatics. Weinheim: Wiley- VCH, 15091531, 2003.
- Oprea, T. I.; Matthe, H. Integrating Virtual Screening in lead Discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, n.4, 349-358, 2004.
- Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v.25, p.1605-1612, 2004.
- Richman et al., 2016 D.D. Richman, R.J. Whitley, F.G. Hayden **Clinical Virology** John Wiley & Sons (2016)
- Ramos, R. M. et al. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-Nacetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. **Journal of molecular modeling**, v. 18, n. 9, p. 40134024, 2012.
- Rocha, J. A. et al. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198476, 2018.

Senhoras, E. M.; Sousa, Y. N. “Cooperação funcional para o desenvolvimento da saúde e os entraves para a diplomacia médica no Brasil”. *Boletim Mundorama*, vol. 70, 2013.

SHARP, Kumar; DANGE, Shubhangi. In-silico FDA-approved drug repurposing to find the possible treatment of Coronavirus Disease-19 (COVID-19). *Journal homepage: www. ijbr. in*, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2020.

Sica DA. Chlorthalidone: has it always been the best thiazide-type diuretic? *Hypertension* 2006;47:321-2.

Solis, F. J.; Wets, R. J.-B. Minimization by random search techniques. **Mathematics of operations research**, v. 6, n. 1, p. 19-30, 1981.

Skeggs JR, Leonard T.; KAHN, Joseph R.; SHUMWAY, Norman P. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine*, v. 103, n. 3, p. 295, 1956.

Tipnis, Sarah R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, 2000

Vasco RF, Moyses RM, Zatz R, Elias RM (2016) Furosemide in-creases the risk of hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 43(6):421–430. doi:10.1159/000446449

Walls, Alexandra C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. **Cell**, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>

Wrapp, Daniel et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260-1263, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>

Yan, Renhong et al. Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by fulllength human ACE2. **Science**, 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>

Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

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. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, **The New England Journal of Medicine**, 2020.

Zhu, Na et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C, Liu S, Zhao P, Liu H, Zhu L, et al (2020) Achados patológicos do COVID-19 associados à síndrome do desconforto respiratório agudo. *Lancet Respir Med*