

ESTUDOS *IN SILICO* DE DITERPENOS EXTRAÍDOS DA *Paubrasilia echinata* Lam. E DERIVADOS FRENTE A INTEGRASE E TRANSCRIPTASE REVERSA DO HIV-1*IN SILICO* STUDIES OF DITERPENES EXTRACTED FROM *Paubrasilia echinata* Lam. AND DERIVATIVES AGAINST HIV-1 INTEGRASE AND REVERSE TRANSCRIPTASESILVA, Fábila Martins¹; RAMOS, Clécio Sousa¹; SCOTTI, Luciana^{2,3}; MONTEIRO, Alex France Messias^{1,2*}¹Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Brasil.²Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba. Brasil.³Gestão de Ensino e Pesquisa, Hospital Universitário, Universidade Federal da Paraíba. Brasil.*Autor correspondente
e-mail: alexfrancem@gmail.com

Received 22 June 2022; received in revised form 23 October 2022; accepted 30 October 2022

RESUMO

Introdução: O HIV é um retrovírus cuja multiplicação viral está associada a três enzimas. A transcriptase reversa, responsável por sintetizar o DNA vital com base em seu RNA; a integrase, responsável por integrar o DNA viral ao DNA humano; e uma protease responsável pela clivagem do código genético em unidades menores e funcionais. Muitos grupos de pesquisas pelo mundo estão motivados na proposta de novos bioativos contra o HIV. **Objetivos:** Propor diterpenos naturais ou produtos sintéticos da espécie de planta Pau-Brasil frente ao vírus HIV por meio de técnicas *in silico*. **Métodos:** Foram utilizados diterpenos encontrados no extrato etanólico do Pau-Brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.), assim como alguns produtos dos mesmos que foram avaliados por meios computacionais. O trabalho foi desenvolvido através de uma triagem híbrida (*ligand based e structure based*) para uma possível atividade biológica desses fitoconstituintes frente às enzimas principais da multiplicação do HIV-1. **Resultados:** Os ensaios computacionais apontaram que os compostos ALX04 e ALX07 apresentaram possível atividade frente às proteínas HIV-integrase e transcriptase reversa, respectivamente. Nenhum composto foi ativo simultaneamente frente às duas enzimas (HIV-integrase e transcriptase reversa), e todos os demais compostos demonstraram-se inativos. **Discussão:** Foram utilizados os diterpenos encontrados no extrato etanólico do Pau-Brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.), assim como alguns derivados, onde foram avaliados através dos métodos computacionais. O trabalho foi desenvolvido por meio de uma seleção híbrida (e baseada e estruturada) realizada para apontar uma atividade viável observável, aos modelos de predição testadas. **Conclusões:** Os ensaios computacionais apontaram os diterpenos ALX04 e ALX07 apresentaram promissora atividade retroviral.

Palavras-chave: *Docking molecular, HIV-1, simulação in silico, Pau-Brasil, toxicidade.*

ABSTRACT

Introduction: HIV, whose viral multiplication is associated with three enzymes. Reverse transcriptase is responsible for synthesizing vital DNA based on its RNA; integrase is responsible for integrating viral DNA into human DNA; and protease is responsible for cleaving the genetic code into smaller, functional units. Many research groups around the world are motivated by the proposal of a new bioactive against HIV. **Objectives:** To propose natural diterpenes or synthetic products from the Pau-Brasil plant species against HIV through *in silico* techniques. **Methods:** Diterpenes found in the ethanolic extract of Pau-Brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) were used, as well as some of their products that were known by computational means. The work was developed through a hybrid screening (ligand-based and structure-based) for a possible biological activity of these phytoconstituents against the main enzymes of HIV-1 multiplication. **Results:** Computational assays showed that the compounds ALX04 and ALX07 showed possible activity against HIV-integrase and reverse transcriptase proteins, respectively. No compound was simultaneously active against the two enzymes (HIV-integrase and reverse transcriptase), and all other compounds proved inactive. **Discussion:** Diterpenes found in the ethanolic extract of Pau-Brasil (*Paubrasilia echinata* Lam.) were used, and some results were obtained through

computational methods. The work was developed to achieve a viable observable activity to the tested prediction models. **Conclusions:** Computational assays showed that the diterpenes ALX04 and ALX07 had promising assays of retroviral activity.

Keywords: Molecular docking, HIV-1, in silico simulation, Pau-Brasil, toxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus de imunodeficiência humana

A AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) é considerada um problema de saúde pública, que acomete pessoas do mundo todo, independentemente de classe social, gênero, raça e outros. Está associada a prática sexual e comportamentos de risco como o compartilhamento de seringas para usuários de drogas injetáveis, contato direto com sangue contaminado e transmissão vertical de mãe para filho. (Machado-Zaldívar *et al.*, 2021; van den Broek, 2021)

A grande maioria dos casos de infecção dão-se pela relação sexual sem o uso do preservativo, sendo o mais eficaz método profilático da doença recomendado pelos órgãos de saúde. A conscientização de hábitos sexualmente seguros e que propiciam menor exposição ao vírus do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) é realizada através de campanhas educativas destinadas a todas as idades. (Presanis *et al.*, 2021; Stone *et al.*, 2021)

Segundo a WHO (*World Health Organization*), a faixa de vulnerabilidade está entre 15 a 49 anos, e milhões de pessoas morrem anualmente vítimas de complicações decorrentes a infecção pelo HIV. É verídica a informação de que a AIDS propriamente dita não é capaz de provocar diretamente a morte do infectado, porém, ocorre a diminuição das células imunológicas devido a infecção pelos retrovírus, assim diminui gradativamente a capacidade de defesa dos anticorpos contra os microrganismos invasores causada pela AIDS. Há relatos que com todos esses problemas acarretados pelo vírus, o indivíduo pode vir a óbito decorrentes de ações infecciosas secundárias como a pneumonia, tuberculose, meningite e outras doenças. (Melo *et al.*, 2021)

De acordo com a WHO, 2021 muitas pessoas vivem com o HIV, segundo dados, a população infectada em 2021 foi cerca de 38,4 milhões, dos quais 19,7 milhões foram mulheres. Segundo o boletim epidemiológico, houveram 1,5 milhões de novos casos de infecção no mundo. Em crianças abaixo de 15 anos de idade corresponde a cerca de 1,7 milhões do total, com 160mil novos casos desde o ano passado,

conforme mostrado na Figura 1. (Giroir, 2020; Jiang *et al.*, 2020)

Resumo da epidemia global de HIV, 2021			
	Pessoas vivendo com HIV	Pessoas adquiriram HIV	Pessoas morreram com HIV
Total	38,4 milhões	1,5 milhões	650 mil
Adultos (15+ anos)	36,7 milhões	1,3 milhões	560 mil
Mulher (15+ anos)	19,7 milhões	640 mil	240 mil
Homem (15+ anos)	16,9 milhões	680 mil	320 mil
Crianças (<15 anos)	1,7 milhões	160 mil	98 mil

Fonte: UNAIDS/WHO

Figura 1. Dados estatísticos do HIV - UNAIDS/WHO.

1.2. Quimioinformática

No desenvolvimento de novos fármacos é possível contar com o auxílio da quimioinformática, com o planejamento racional de novos bioativos. Através das ferramentas *in silico* os cientistas são capazes de prever uma determinada atividade biológica, analisando vários parâmetros estruturais, com base em moléculas cujas atividades já foram testadas. (Brian, 2021; Monica *et al.*, 2021)

Estudos de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) e outros métodos computacionais reduzem custos vinculados as pesquisas, e preveem possíveis resultados satisfatórios, contudo, os métodos *in silico* possuem suas margens de erros inerentes dos processos, mas estes podem ser reduzidos através de cuidadosas validações que vão se aprimorando ao longo da aplicabilidade das ferramentas de química computacional. (Bhole *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2021)

1.3. *Paubrasilia echinata* Lam.

O gênero *Caesalpinia* pertence à família *Fabaceae*. No mesmo encontra-se aproximadamente 100 espécies de plantas que estão distribuídas geograficamente em todo o mundo em regiões subtropicais e tropicais (Lichtenberg *et al.*, 2022; Mescia *et al.*, 2022; Xavier *et al.*, 2022).

O Pau-Brasil, assim popularmente

conhecido (*Paubrasilia echinata* Lam.), foi a primeira espécie de árvore brasileira encontrada historicamente pelos portugueses e comercializadas por causa que nela encontram-se corantes que eram usados para a fabricação de tintura para roupas (Carvalho *et al.*, n.d.; Correia Soeiro *et al.*, 2022).

O presente trabalho teve como objetivo propor a utilização de diterpenos naturais ou produtos sintéticos da espécie de planta Pau-Brasil, frente ao vírus HIV, por meio de técnicas *in silico*, visando impedir a replicação do vírus.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Todos as análises computacionais foram realizadas no sistema operacional Microsoft Windows 8.1, assim como programa de editor de texto Microsoft Word e criador de planilhas e tratamentos estatísticos o programa Microsoft Excel ambos do pacote Microsoft Office 365.

Para obtenção das estruturas 2D das moléculas estudadas foi utilizado o programa MarvinSketch v22.9 da Chemaxon, e para otimização e obtenção das estruturas 3D foi o programa HyperChem™ v7.5.

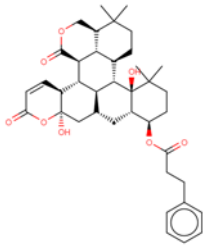
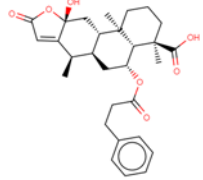
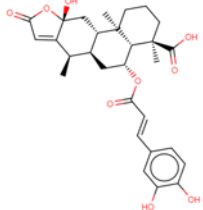
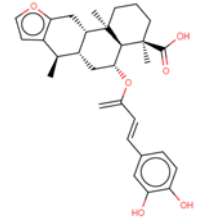
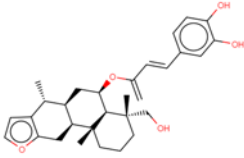
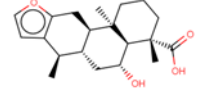
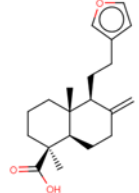
Cinco moléculas (Tabela 1) foram usadas como controles, estas moléculas correspondem a estruturas químicas de fármacos que são comumente usadas no tratamento anti-HIV:

Tabela 1. Controles usados na pesquisa.

ID	Inibição	Nome	Sigla	%Abs
C01	IN	Raltegravir	RAL	57.24
C02	IN	Dolutegravir	DTG	74.78
C03	TR	Lamivudina	3TC	69.86
C04	TR	Zidovudina	AZT	72.83
C05	TR	Efavirenz	EFZ	95.78

Os compostos ALX01-ALX07 (Tabela 2) são diterpenos isolados a partir do extrato etanólico dos caules da *Paubrasilia echinata* e derivados inspirados pela pesquisa publicada em 2011 (Cota *et al.*, 2011), conforme mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Relação dos compostos diterpenos testados.

ID	Structure
ALX01	
ALX02	
ALX03	
ALX04	
ALX05	
ALX06	
ALX07	

Para a construção dos modelos de predição foi usado o software KNIME Analytics Platform 3.7, utilizando o classificador *RandomForest* e o preditor *Weka* 3.7 para elaborar um workflow baseada em uma floresta de árvores de decisão randômica para as predições realizadas. (Leite *et al.*, 2021; Silverio, 2021).

Os descritores moleculares foram obtidos através do programa Dragon 5, com 1310 descritores moleculares calculados.

Para o cálculo da área de superfície topológica polar (TPSA), violações da regra de Lipinski foi utilizado o programa gratuito Drug Likeness Tool - DruLiTo para windows [http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html] (Umar et al., 2021)

Para os riscos de citotoxicidade as estruturas foram importadas para o programa gratuito OSIRIS DataWarrior v5.5.0, avaliando quatro parâmetros toxicológicos: carcinogênese (CAR), mutagênese (MUT), irritabilidade do tecido (IRR) e efeito tóxico no sistema reprodutor (ESR).

Os metabólitos hepáticos foram obtidos importando os códigos *smiles* das moléculas testadas para o servidor online GLORY (*Generator of the Structures of Likely Cytochrome P450 Metabolites Based on Predicted Sites of Metabolism*) (de Bruyn Kops et al., 2019; Stork et al., 2019), assim, obtendo os metabólitos mais abundantes no processo.

Para o estudo do acoplamento molecular as moléculas foram importadas as moléculas estudadas aprovadas nas etapas anteriores, estas moléculas interagiram no sítio ativo dos receptores PDB ID 1QS4 integrase (IN) e PDB ID 2RF2 transcriptase reversa (TR).

Para esse estudo de ancoragem foi usado o programa Molegro Virtual Docker 6.0, levando em consideração o algoritmo *MolDock Score* para avaliação da eficiência de interação.

2.3 Métodos

Foi realizada inicialmente uma triagem virtual híbrida que consiste em uma abordagem baseada no ligante juntamente com a proteica de forma combinada. Assim é possível obter as moléculas com melhores perfis farmacológicos *in silico*, analisando a biodisponibilidade, a absorção, os riscos de citotoxicidade, a interação ligante-receptor a estabilidade no sítio ativo e a predição da atividade biológica.

A triagem virtual consiste na classificação de substâncias com base nas características que melhor explicam a atividade biológica a ser observada, estas características podem estar vinculada a um grupo funcional da molécula ou a uma ligação de hidrogênio que possa ser útil e servir para nortear análogos com atividade promissora a partir das melhorias realizadas nessas características.

Esta abordagem é conhecida como planejamento racional de fármacos, muito usada em pesquisas na área de química de fármacos,

contribuindo ainda, para a diminuição do tempo de bancada, desperdício de solventes na síntese de novos bioativos. (Tibúrcio, 2022)

Tanto os compostos testados quanto os controles foram desenhados para obtenção da estrutura 2D, em seguida foram importados para o Hyper para obtenção da sua estrutura 3D otimizada. A otimização das suas estruturas químicas, foram realizadas através do método da mecânica molecular (MM+) e semiempírico (AM1) para obtenção de suas estruturas químicas tridimensionais. (Moura, 2021)

As moléculas para a construção dos modelos de predição foram extraídas do banco de dados de estruturas químicas ChEMBL Database utilizando a palavra chave "*Human Immunodeficiency Virus*", obtendo os conjuntos de moléculas ChEMBL3471 para integrase e ChEMBL247 para transcriptase reversa do HIV-1.

A acuragem das planilhas obtidas conforme mencionado acima, foi feita removendo-se todas as moléculas repetidas, pelo critério de moléculas com massa molecular superior a 800 g/mol, células vazias, conversão das atividades (IC₅₀) para molar, remoção de solventes, remoção de sais e estruturas com erros de valência.

2.3.1 Modelos de predição – atividade biológica, permeabilidade e absorção intestinal

Foram desenvolvidos cinco modelos, um para prever a possível atividade biológica frente a enzima protease, um frente a integrase, um frente a transcriptase reversa, um para a absorção intestinal (HIA) e outro para a permeabilidade no intestino (CACO-2). (Bencheikh et al., 2022; Forrestall et al., 2021)

Esses modelos geraram dados para a discussão da sua capacidade preditiva, além da validação interna cruzada, foram calculados os coeficientes de correlação de Matthews (MCC) para avaliar a qualidade de todos os modelos. (Albertini, 2022; Monteiro, 2021)

2.3.2 Taxa de absorção oral, riscos de citotoxicidade e violações a regra de Lipinski

A taxa de absorção oral (%Abs) foi calculada com base na área de superfície topológica polar de cada uma das estruturas avaliadas, utilizando a Equação 1 (Ahsan et al., 2016; Gonzalez et al., 2018; Tuncbilek et al., 2018):

$$\%Abs = 109 - (0.345 \times TPSA) \quad (\text{Eq.1})$$

Ao utilizar a taxa de absorção como parâmetro de exclusão na triagem virtual, apenas são considerados as moléculas que apresentam %Abs igual ou superior a menor taxa dentre os fármacos usados como controle.

Avaliando os riscos de toxicidade foram considerados as estruturas sem riscos em nenhum dos quatro parâmetros toxicológicos estudados (CAR, MUT, IRR, ESR). (Sánchez-Suárez *et al.*, 2022; Sander *et al.*, 2015).

2.3.3 Predição dos metabólitos hepáticos

Após a obtenção dos metabólitos hepáticos, essas estruturas tiveram seus descritores moleculares calculados, e foram analisados os riscos de toxicidades dos metabólitos de alto score, qualquer molécula ALX01-ALX09 que apresentasse metabólitos com score acima de 50%, e com alto risco de toxicidade em algum parâmetro foram desconsiderados das análises posteriores, ao longo o desenvolvimento computacional desse estudo.

2.3.4 Simulação de docking molecular

As moléculas foram submetidas ao Molegro para obtenção das suas energias de interação do complexo ligante-receptor na ancoragem molecular, para cada molécula que foi aprovada ao longo da triagem até esta etapa, frente a integrase e a transcriptase reversa do HIV-1.

Além do *docking*, foi realizado o *redocking* com o ligante complexado junto a proteína com as mesmas condições computacionais que o *docking* original, fazendo com que seja possível a estimativa do RMSD (*Root Mean Square Deviation*), que é o valor do desvio entre os mesmos átomos do ligante complexado junto a proteína e o mesmo ligante importado, com ele é possível validar o protocolo usado para o acoplamento, quanto mais baixo o RMSD melhor a precisão do encaixe molecular realizado, comumente adotados valores menores que 2Å (Santos, 2021).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Resultados

Os compostos ALX01 a ALX07 foram submetidos a um modelo de predição de atividade biológica frente a proteína integrase do HIV-1, conforme os dados da Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da predição da atividade inibitória frente a IN.

ID	Domínio	ATV	%ATV
ALX01	Não confiável	Inativo	46.42
ALX02	Confiável	Inativo	33.35
ALX03	Confiável	Inativo	46.91
ALX04	Confiável	Ativo	52.42
ALX05	Confiável	Inativo	46.83
ALX06	Confiável	Inativo	32.82
ALX07	Confiável	Inativo	42.15

ATV = Predição de atividade; %ATV = Probabilidade de possível atividade.

Também foram avaliadas as possíveis atividades frente a enzima transcriptase reversa, conforme mostrada na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4. Resultados da predição da atividade inibitória frente a TR.

ID	Domínio	ATV	%ATV
ALX01	Não confiável	Inativo	15.50
ALX02	Confiável	Inativo	23.00
ALX03	Confiável	Inativo	20.00
ALX04	Confiável	Inativo	37.00
ALX05	Confiável	Inativo	40.50
ALX06	Confiável	Inativo	43.00
ALX07	Confiável	Ativo	55.00

Foram calculados os dados importantes para a avaliação da confiabilidade do modelo de predição de atividade anti-HIV, esses dados estão discriminados na Tabela 5:

Tabela 5. Dados estatísticos dos modelos criados.

	IN		TR	
	Teste	Cross	Teste	Cross
SENS	0.83	0.80	0.87	0.86
ESPEC	0.86	0.81	0.89	0.85
MCC	0.69	0.62	0.76	0.71
Acurácia	0.84	0.81	0.88	0.85
Curva ROC	91.97	87.64	96.71	93.99

Teste = grupo de teste do modelo de predição;
Cross = grupo de validação cruzada.

Após a atividade predita, também foram obtidas as probabilidades da permeabilidade intestinal (CACO-2) e a absorção intestinal (HIA), através de modelos de predição no KNIME, com parâmetros semelhantes aos das predições das atividades. Os dados podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos modelos de CACO-2 e HIA.

ID	CACO-2		
	Domínio	ATV	%ATV
ALX04	Confiável	Permeável	80.00
ALX07			93.00
HIA			
ALX04	Confiável	Absorvível	83.50
ALX07			94.00

Os dados estatísticos, com relação a confiabilidade dos modelos gerados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados estatísticos comparativos dos modelos de CACO-2 e HIA.

	CACO-2	
	Teste	Cross
SENS	0.97	0.97
ESP	0.68	0.56
MCC	0.67	0.61
Acurácia	0.83	0.88
Curva ROC	87.27	87.22

	HIA	
	Teste	Cross
SENS	0.90	0.96
ESP	0.65	0.70
MCC	0.57	0.50
Acurácia	0.90	0.85
Curva ROC	89.06	90.94

SENS = sensibilidade; ESP = especificidade e MCC = coeficiente de correlação de Matthews.

Após as predições foram obtidos os dados computacionais referentes aos parâmetros toxicológicos, conforme Tabela 8:

Tabela 8. Resultados da predição dos riscos de toxicidade.

ID	MUT	CAR	ESR	IRR	TOX
ALX04	Não	Não	Não	Não	Não
ALX07	Não	Baixo	Não	Não	Sim

MUT = Mutagenicidade; CAR = carcinogenicidade; ESR = efeito tóxico no sistema reprodutor; IRR = irritabilidade do tecido e TOX = toxicidade total.

Já os dados da taxa de absorção por via oral (%Abs) e violações a regra de Lipinski (LIP) são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados da taxa de absorção oral e violações a regra de Lipinski.

ID	%Abs	LIP
ALX04	74.46	1
ALX07	91.60	0

Tomando como base apenas as estruturas de cada molécula testada (*ligand based*), é pertinente apresentar os dados *structure based*, iniciando pela simulação de *docking* molecular, as

energias de interação ligante-receptor podem ser vistas na Tabela 10 a seguir:

Tabela 10. Dados do docking molecular para IN e TR.

Composto	ENERGIA _{IN}	ENERGIA _{TR}
	kcal/mol	
ALX04	-99.65	-
Dolutegravir	-66.85	-
Ligante _{IN}	-76.33	-
Raltegravir	-50.21	-
ALX07	-	-107.98
Efavirenz	-	-131.20
Lamivudina	-	-84.23
Ligante _{TR}	-	-145.28
Zidovudina	-	-100.98
RMSD	0.16	0.41

Iniciando a triagem com base na estrutura do receptor, conforme pode ser visto na Tabela 10, os dois diterpenos testados apresentaram afinidades consideráveis com os receptores testados, o composto ALX04 apresentou Energia_{IN} = -99.65 kcal/mol, uma energia inferior ao ligante complexado junto a proteína escolhida.

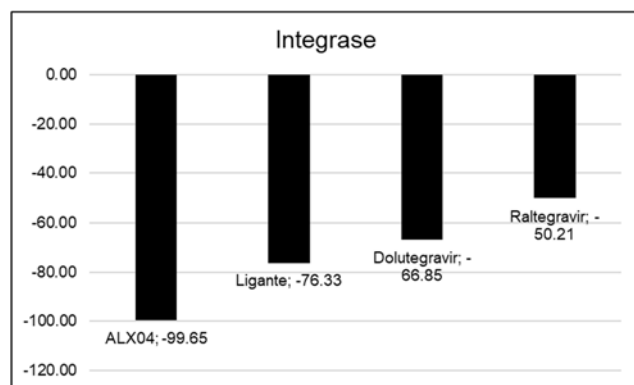


Figura 2. Gráfico das energias ligante-receptor da IN.

Na Figura 2, o diterpeno ALX04 apresentou energia mais baixa, não apenas com o ligante, mas também aos controles positivos considerados dolutegravir (-66.85 kcal/mol) e raltegravir (-50.21 kcal/mol).

Já para TR os resultados também foram promissores, onde o composto ALX07 apresentou energia de interação ligante-receptor Energia_{TR} de -107.98 kcal/mol, valor menor que os controles zidovudina (-100.98 kcal/mol) e lamivudina (-

84.23 kcal/mol), conforme a Figura 3.

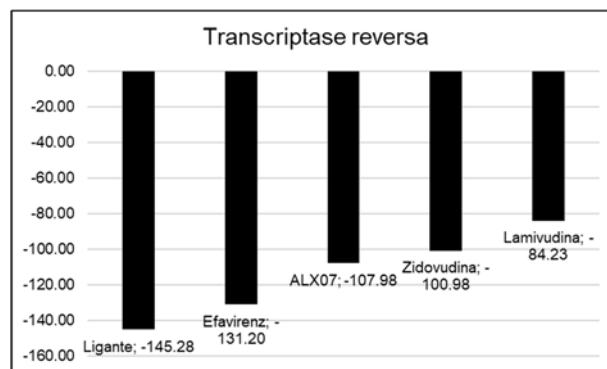


Figura 3. Gráfico das energias ligante-receptor da TR.

Na Tabela 11 são mostradas as interações encontradas no estudo de docking molecular dos dois diterpenos estudados:

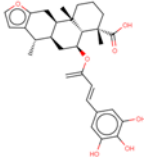
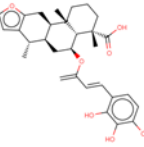
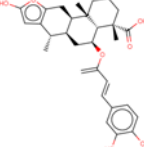
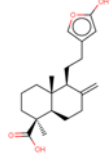
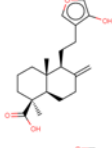
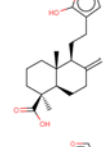
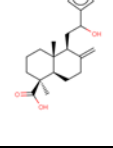
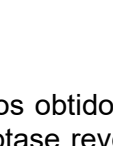
Tabela 11. Relação das interações com os resíduos de aminoácidos de IN e TR.

Ligante	TR			
	H	Estérica		
ALX07	Lys103	2Lys101	His235	Leu234
	Pro236	Leu100	Tyr318	His235
		Val179	Tyr188	Lys103
Efavirenz	2Lys101	2Lys101	2Val106	Pro236
		His235	Val106	Val179
Lamivudina	Lys101	Tyr188	Lys101	2Tyr181
	Pro236			
Zidovudina	Val179	2Tyr188	Tyr181	
	Lys101	His235	Pro236	2Lys101
	Lys103			
Ligante	IN			
	Lys159			
ALX04	2Thr66	2Glu152	Lys159	
	Asn155			
	2Lys156			
	2Glu152			
Raltegravir	Thr66			
	Cys65	2Asn155	Lys156	Thr66
	Glu92	4Glu152	2Asp64	Ile151
	His67	His67	Cys65	Gln148
	Asp64			
Dolutegravir	Asp116			
	2Lys156	2Glu152	Asp64	
	2Asn155	Asn155	Ile151	
Dolutegravir	Thr66			
	Asn155	2Thr66	3Lys159	Asn155
	2Gln148	2Asp64	Asp116	Lys156
	Asp64	3Glu152	Ile151	

Os dois compostos (ALX04 e ALX07) foram importados ao programa online Glory, para a predição de seus metabólitos hepáticos, assim como a predição das abundâncias de cada

espécie no processo metabólico. Com isso, os metabólitos mais expressivos tiveram suas toxicidades avaliadas de acordo com os dados obtidos no OSIRIS, conforme mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Tabela contendo os metabólitos hepáticos dos diterpenos ALX04 e ALX07.

IDComp	%Abundância	Tox	Estrutura
ALX04	100.00	Não	
	74.34		
	69.06		
	100.00		
ALX07	80.54	Baixa CAR	
	75.11		
	69.23		
			

3.2. Discussões

De acordo com os resultados obtidos nos dois modelos (integrase e transcriptase reversa), apenas o composto ALX04 apresentou atividade frente a integrase com 52.42% de provável atividade. Já para TR, apenas o composto ALX07 apresentou atividade, com probabilidade de 55% de acordo com o modelo criado, segundo os dados das Tabelas 3 e 4.

Avaliando os dados estatísticos (Tabela 5) com relação a sensibilidade dos modelos

apresentados, ou seja, a capacidade que o modelo apresenta de acertar a predição das moléculas ativas, em ambos os modelos foi entre 80-87% entre o grupo de teste e a validação interna cruzada de cada modelo. Além disso, o mesmo acontece com a especificidade, que corresponde ao acerto dos inativos, sendo os modelos sensível e específico, ou seja, capaz de acertar a partir de 80% a predição de ativos e inativos.

Outro dado estatístico que vale mencionar acerca dos outros modelos, é que a taxa total de acerto além de ficar também acima de 80% (acurácia), como consequência a performance do modelo está variando entre 87.64-93.99% de acordo com a curva ROC. Ainda mais, o coeficiente de correlação de Matthews exprime a qualidade das informações, com valores acima de 0.5 então os modelos podem ser considerados preditivos, com boa confiabilidade.

Avaliando a possível absorção e permeabilidade no intestino expressos na Tabela 6, os compostos testados apresentaram bons resultados para predição de CACO-2 e HIA, indicando uma tendência a apresentarem boa biodisponibilidade e resposta biológica, contribuindo para a proposição das moléculas como possíveis retrovirais.

Através dos dados da Tabela 7, os modelos de CACO-2 e HIA apresentam boa capacidade de acerto tanto para positivos quanto negativos (sensibilidade e especificidade acima de 60%), sendo os modelos mais sensíveis, ou seja, com melhor capacidade de predizer verdadeiros positivos, como também boa qualidade na predição global (MCC > 50%), podem considerar os resultados confiáveis.

O composto com probabilidade de inibição da IN (ALX04) não apresentou riscos de toxicidade em nenhum dos 4 parâmetros avaliados (Tabela 8). Em contra partida, o composto ALX07, com possibilidade de inibição da TR, apresentou baixo risco de carcinogênese.

Contudo, os efeitos tóxicos de muitos retrovirais são amplamente conhecidos e relatados em diversos estudos, por isso a molécula ALX07 mesmo tendo apresentado baixo risco citotóxico, será considerada para o restante das análises teóricas deste estudo. (dos Santos Silva *et al.*, 2022; Gonçalves *et al.*, 2022)

Discutindo outro parâmetro ADMET, conforme mostrado na Tabela 1, a menor taxa de absorção verificada entre os controles positivos foi para o raltegravir (57.24%). Sendo assim, as duas moléculas (ALX04 e ALX07) cuja taxa de

absorção fora calculada apresentaram resultados superiores a menor taxa observada entre os controles considerados, com %Abs entre 74-92% é possível esperar a possível administração por via oral destes bioativos, melhorando a viabilidade e biodisponibilidade do possível medicamento.

Além da viabilidade, para análise da possível biodisponibilidade é necessário levar em consideração outros parâmetros farmacodinâmicos e cinéticos, além dos econômicos e logísticos envolvidos. Uma propriedade útil que foi calculada nesse estudo são as violações a regra de Lipinski, na qual aponta que um bioativo promissor deve violar apenas uma regra, condição vista nos dois compostos estudados nesta etapa.

No docking molecular foi observado que os compostos estudados apresentaram afinidade significativa com o respectivo receptor, o composto ALX04 apresentou energia do complexo ligante-receptor mais baixa, indicando que esse complexo possui melhor afinidade que o ligante complexo e os controles testados, podendo indicar que o composto apresente ação inibitória no sítio ativo.

Semelhante aconteceu com o composto ALX07, que apresentou bons resultados de interação, inclusive frente ao AZT, que dentre os controles frente a RT é o mais usado em pesquisas na proposição de retrovirais para HIV-1.

Analisando a Tabela 11 é possível perceber que, existem várias interações comuns entre os compostos submetidos, para o ancoramento molecular do composto ALX04 também foi observado interações semelhantes, conforme mostrado, com o inibidor e o raltegravir com o resíduo Thr66 numa interação de hidrogênio, e algumas estéricas como Glu152, Asp64, Asn155, Lys156 e Ile151.

Já o composto ALX07 apresentou interações de hidrogênios comuns com os controles lamivudina (Pro236) e zidovudina (Lys103), e estéricas com todos os inibidores de IN usados como controle, incluindo com o ligante (Lys101 e His235).

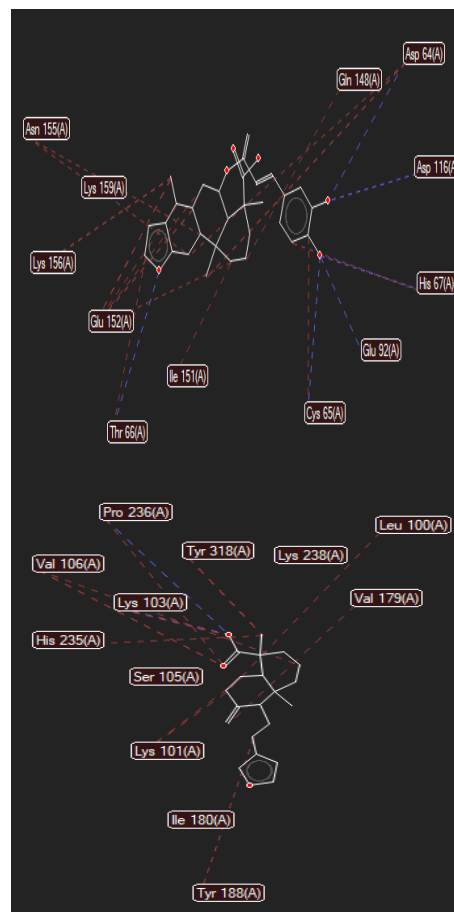


Figura 4. Esquema gráfico das interações entre ALX04 e o inibidor complexado junto a IN.

As interações tanto de hidrogênio quanto estéricas podem ser vistas da Figura 4, é possível perceber que o maior número de interações do ALX04 está nos oxigênios aromáticos e em suas vizinhanças. No composto ALX07 é visto uma concentração maior de interações com o éster ligado a dois anéis não aromáticos, mostrado na Figura 5:

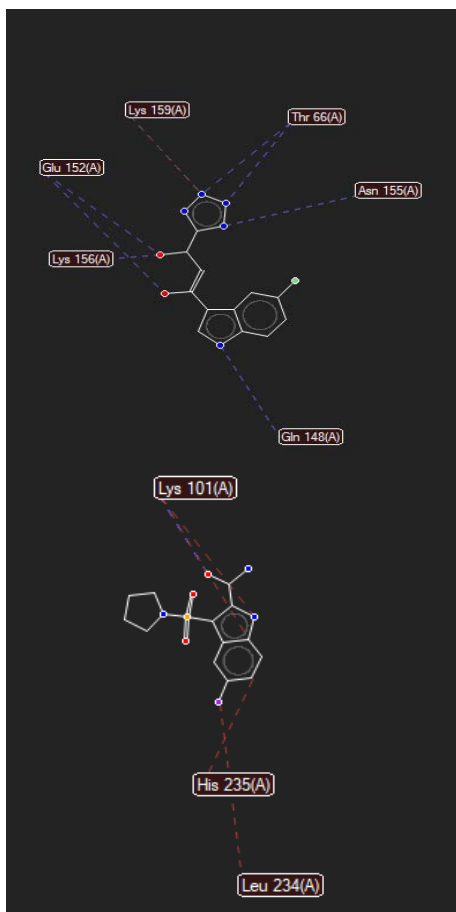


Figura 5. Esquema gráfico das interações entre ALX07 e inibidor complexo junto a TR.

Para a molécula ALX04 é possível perceber que os anéis condensados se mantiveram após processo metabólico, modificando a posição dos substituintes do anel aromático do éter conjugado, outra observação foi a acerca desses metabólitos é que o éster alifático ligado a cadeia de anéis condensado se manteve nos metabólitos de maior abundância.

As observações acima, levam a acreditar que o processo metabólico hepático simulado, não modificou o possível grupo farmacofórico das duas moléculas testadas, tendo em vista que, os contribuintes observados no *docking* molecular mantiveram-se sem alterações significativas, como também não influenciou negativamente na predição dos riscos de toxicidade das moléculas precursoras.

Para a transcriptase reversa o ligante apresentou interações próximas aos anéis aromáticos conjugados, incluindo o nitrogênio do anel indólico e não na amida como esperada com base nas interações observadas no composto ALX07.

Contudo, a existência de anéis aromáticos com átomos capazes de promover ligações de hidrogênio como o nitrogênio e oxigênio, assim

como funções alifáticas vizinhas contendo esses átomos, apresentaram importância nos acoplamentos moleculares observados.

Semelhantemente aconteceu com o composto ALX07, onde os metabólitos abundantes diferem-se estruturalmente de seus precursores basicamente pela posição da hidroxila ligada ao anel aromático de cinco membros. Ou seja, a estrutura cíclica da molécula também pode ser considerada o grupo farmacofórico, pois está diretamente associada ao acoplamento molecular, conforme mostrado na simulação de *docking* com a TR.

Os demais diterpenos extraídos do Pau-Brasil, não apresentaram atividades frente a nenhuma das principais proteínas do HIV, as proteínas responsáveis pela multiplicação retroviral, contudo juntamente com elas foram testadas moléculas sem a carbonila que se ligam aos anéis condensados, estes apresentaram resultados promissores.

4. CONCLUSÕES

Dentre os nove compostos testados inicialmente, apenas 2 apresentaram atividades promissoras, no qual o composto ALX04 apresentou possível atividade frente a integrase e o composto ALX07 para a transcriptase reversa.

Sugere-se, portanto, que os diterpenos modificados podem apresentar atividade inibitória para a integrase e os naturais para transcriptase reversa.

Estudos biológicos devem ser considerados em pesquisas posteriores, para validar todo o estudo apresentado nesta pesquisa, contudo pesquisas como esta impulsionam cientistas que trabalham com o planejamento e/ou desenvolvimento de retrovirais.

5. DECLARAÇÕES

5.1. Limitações do estudo

O estudo é limitado aos compostos simulados, aos softwares utilizados e as simulações realizadas.

5.2. Acknowledgements

CNPQ, CAPES e FACEPE

5.3. Fonte de financiamento

CNPQ, CAPES e FACEPE

5.4. Competing Interests

Nenhum conflito de interesses

5.5. Open Access

Este artigo está licenciado sob uma Licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC BY 4.0) Internacional, que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que você dê os devidos créditos ao(s) autor(es) original(is) e a fonte, fornecer um link para a licença Creative Commons e indicar se foram feitas alterações. As imagens ou outro material de terceiros neste artigo estão incluídos na licença Creative Commons do artigo, salvo indicação em contrário em uma linha de crédito para o material. Se o material não estiver incluído na licença Creative Commons do artigo e seu uso pretendido não for permitido por regulamentação legal ou exceder o uso permitido, você precisará obter permissão diretamente do detentor dos direitos autorais. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

6. REFERÊNCIAS

1. Ahsan, M. J., Amir, M., Bakht, M. A., Samy, J. G., Hasan, M. Z., & Nomani, M. S. (2016). Synthesis and antimicrobial activity of N1-(3-chloro-4-fluorophenyl)-N4-substituted semicarbazone derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S861–S866.
2. Albertini, T. T. (2022). *Aplicação de redes neurais artificiais para a predição da atividade biológica de compostos visando contribuição para a farmacologia: revisão bibliográfica*.
3. Bencheikh, B., Cheriet, M., Djemil, R., & Khatmi, D. (2022). In Silico Study of Selected Natural Products as SARS-CoV-2 MPro Binder: Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 1–13.
4. Bhole, R. P., Bonde, C. G., Bonde, S. C., Chikhale, R. V., & Wavhale, R. D. (2021). Pharmacophore model and atom-based 3D quantitative structure activity relationship (QSAR) of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) capsid assembly inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(2), 718–727.
5. Brian, W. (2021). *Bioinformatics and machine learning in prevention, detection and treatment of HIV/AIDS*. Brac University.
6. Carvalho, J. C. S., Silveira, E. R., & Matos, T. M. (n.d.). Perspectivas na pesquisa de Plantas Medicinais Brasileiras. *Laboratório de Anatomia Vegetal*, 194.
7. Correia Soeiro, M. de N., Vergoten, G., & Bailly, C. (2022). Molecular docking of brazilin and its analogs to barrier-to-autointegration factor 1 (BAF1). *Annals of the New York Academy of Sciences*.
8. Cota, B. B., Siqueira, E. P., Zani, C. L., & Oliveira, D. M. (2011). New diterpenes of *Caesalpinia echinata* Lam. *34 Annual Meeting of the Brazilian Chemical Society - Chemistry for a Better World*. http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:43081146
9. de Bruyn Kops, C., Stork, C., Šícho, M., Kochev, N., Svozil, D., Jeliakzova, N., & Kirchmair, J. (2019). GLORY: Generator of the Structures of Likely Cytochrome P450 Metabolites Based on Predicted Sites of Metabolism. *Frontiers in Chemistry*, 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00402>
10. Ding, X., Kang, D., Sun, L., Zhan, P., & Liu, X. (2021). Combination of 2D and 3D-QSAR Studies on DAPY and DANA Derivatives as Potent HIV-1 NNRTIs. *Journal of Molecular Structure*, 131603.
11. dos Santos Silva, R. R., Roma, R. R., da Silva Chagas, F. D., & Freitas, A. L. P. (2022). MAPPING OF PATENTS RELATED TO PROTEASE INHIBITORS AND HIV. *Revista INGI-Indicação Geográfica e Inovação*, 6(2), 1636–1645.
12. Forrestall, K. L., Burley, D. E., Cash, M. K., Pottie, I. R., & Darvesh, S. (2021). 2-Pyridone natural products as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Chemico-Biological Interactions*, 335, 109348.
13. Giroir, B. P. (2020). The time is now to end the HIV epidemic. *American Journal of Public Health*, 110(1), 22–24.
14. Gonçalves, B. C., de Araujo Lima, N., Franchi, M. G., Batista, A. P., Maria, L. A. A., dos Santos, R. F., Soares, B. C., Vicco, L. R., do Vale Senedese, M. S., & Pereira, C. D. (2022). FATORES QUE INFLUENCIAM A ADESÃO DA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV). *RECIMA21-Revista Científica Multidisciplinar-ISSN*

- 2675-6218, 3(4), e341341–e341341.
15. Gonzalez, M. M., Cabrerizo, F. M., Baiker, A., Erra-Balsells, R., Osterman, A., Nitschko, H., & Vizoso-Pinto, M. G. (2018). β -Carboline derivatives as novel antivirals for herpes simplex virus. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(4), 459–468.
 16. Jiang, H., Zhou, Y., & Tang, W. (2020). Maintaining HIV care during the COVID-19 pandemic. *The Lancet HIV*, 7(5), e308–e309.
 17. Leite, D. R. A., de Moraes, R. M., & Lopes, L. W. (2021). Método de Aprendizagem de Máquina para Classificação da Intensidade do desvio vocal utilizando Random Forest. *Journal of Health Informatics*, 12.
 18. Lichtenberg, S., Huber-Sannwald, E., Reyes-Agüero, J. A., Anhuf, D., & Nehren, U. (2022). Pau-brasil and string instrument bows telecouple nature, art, and heritage. *Ecology and Society*, 27(1).
 19. Machado-Zaldívar, L. Y., Blanco-de Armas, M., Dubed-Echevarría, M., Díaz-Torres, H. M., López-Rizo, L. S., Pérez-Guevara, M. T., Lantero-Abreu, M. I., & Rodríguez-Acosta, M. (2021). Pretreatment HIV Drug-resistance Surveillance as a Tool for Monitoring and Control of the HIV/AIDS Epidemic in Cuba. *MEDICC Review*, 23(2).
 20. Melo, G. C. de, Carvalho, A. C. A., Moreira, A. da S., & Paixão, J. T. dos S. (2021). Tempo de sobrevida e distância para acesso a tratamento especializado por pessoas vivendo com HIV/Aids no estado de Alagoas, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 24.
 21. Mescia, T. B., Louro, R. P., Barbedo, C. J., Carbonero, E. R., Figueiredo-Ribeiro, R. de C. L., & Braga, M. R. (2022). Changes in cell wall composition and ultrastructure related to desiccation during the seed maturation of *Paubrasilia echinata* (brazilwood). *Protoplasma*, 1–15.
 22. Monica, G. La, Lauria, A., Bono, A., & Martorana, A. (2021). Off-Target-Based Design of Selective HIV-1 PROTEASE Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6070.
 23. Monteiro, A. F. M. (2021). *Triagem virtual híbrida, predições admet e modelagem molecular de compostos 2-aminotiofenos frente ao HIV-1.*
 24. Moura, É. P. de. (2021). *Estudo in silico de flavonoides e compostos análogos pertencentes à família Asteraceae contra a doença de Alzheimer.*
 25. Presanis, A. M., Harris, R. J., Kirwan, P. D., Miltz, A., Croxford, S., Heinsbroek, E., Jackson, C. H., Mohammed, H., Brown, A. E., & Delpech, V. C. (2021). Trends in undiagnosed HIV prevalence in England and implications for eliminating HIV transmission by 2030: an evidence synthesis model. *The Lancet Public Health*, 6(10), e739–e751.
 26. Sánchez-Suárez, J., Villamil, L., Díaz, L., & Coy-Barrera, E. (2022). Uncovering Streptomyces-Derived Compounds as Cosmeceuticals for the Development of Improved Skin Photoprotection Products: An In Silico Approach to Explore Multi-Targeted Agents. *Scientia Pharmaceutica*, 90(3), 48.
 27. Sander, T., Freyss, J., Von Korff, M., & Rufener, C. (2015). DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(2), 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
 28. Santos, A. K. F. de S. (2021). *Avaliação comparativa da atividade antinociceptiva e mecanismo de ação decorrente da administração de 3, 4, 5-trimetoxicinamato de metila (M-TMCA) e 3, 4, 5-trimetoxicinamato de butila (B-TMCA) em camundongos.*
 29. Silverio, P. S. de S. N. (2021). *3D-QSARpy: Combinando estratégias de seleção de atributos e técnicas de aprendizado de máquina para construir modelos QSAR 3D.*
 30. Stone, J., Mukandavire, C., Boily, M., Fraser, H., Mishra, S., Schwartz, S., Rao, A., Looker, K. J., Quaipe, M., & Terris-Prestholt, F. (2021). Estimating the contribution of key populations towards HIV transmission in South Africa. *Journal of the International AIDS Society*, 24(1), e25650.
 31. Stork, C., Embruch, G., Šícho, M., de Bruyn Kops, C., Chen, Y., Svozil, D., & Kirchmair, J. (2019). NERDD: a web portal providing access to in silico tools for drug

- discovery. *Bioinformatics*.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz695>
32. Tibúrcio, R. da S. (2022). *Planejamento, síntese e avaliação do potencial de novos 2-aminoselenofenos como candidatos a fármacos leishmanicidas*.
 33. Tuncbilek, M., Kucukdumlu, A., Guven, E. B., Altiparmak, D., & Cetin-Atalay, R. (2018). Synthesis of novel 6-substituted amino-9-(β -d-ribofuranosyl) purine analogs and their bioactivities on human epithelial cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(3), 235–239.
 34. Umar, H. I., Saliu, T. P., Josiah, S. S., Ajayi, A., & Danjuma, J. B. (2021). In silico studies of bioactive compounds from selected African plants with inhibitory activity against nitric oxide synthase and arginase implicated in asthma. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22(1), 1–16.
 35. van den Broek, N. (2021). Mini commentary on BJOG-20-1962. R1 'Slower response to treatment of iron deficiency anemia in HIV-infected pregnant women: a prospective cohort study' Anaemia in pregnancy remains a global health problem. *Authorea Preprints*.
 36. Xavier, Y. K. da S., Sobral, M. de A., Lima, G. M. de S., Silva, T. D. da, Ferreira, A. M. M. S., Souza, F. A. de, Souza, I. A. de, & Maia, C. S. (2022). Caracterização fitoquímica e atividade antifúngica do extrato etanólico obtido da mistura de sementes e vagens de *Caesalpinia echinata* Lam / Phytochemical characterization and antifungal activity of the ethanolic extract obtained from the seed and pod mix. *Brazilian Applied Science Review*, 6(2), 375–390. <https://doi.org/10.34115/basrv6n2-003>

Tabela 11. Relação das interações com os resíduos de aminoácidos de IN e TR.

TR				
Ligante	H	Estérica		
		2Lys101	His235	Leu234
ALX07	Lys103	Leu100	Tyr318	His235
	Pro236	Val179	Tyr188	Lys103
		2Lys101	2Val106	Pro236
Efavirez	2Lys101	His235	Val106	Val179
		Gly190		
Lamivudina	Lys101	Tyr188	Lys101	2Tyr181
	Pro236			
Zidovudina	Val179			
	Lys101	2Tyr188	Tyr181	2Lys101
	Lys103	His235	Pro236	
IN				
Ligante	Lys159			
	2Thr66			
	Asn155	2Glu152	Lys159	
	2Lys156			
ALX04	2Glu152			
	Thr66			
	Cys65			
	Glu92	2Asn155	Lys156	Thr66
	His67	4Glu152	2Asp64	Ile151
	Asp64	His67	Cys65	Gln148
	Asp116			
Raltegravir	2Lys156			
	2Asn155	2Glu152	Asp64	
	Thr66	Asn155	Ile151	
Dolutegravir	Asn155	2Thr66	3Lys159	
	2Gln148	2Asp64	Asp116	Asn155
	Asp64	3Glu152	Ile151	Lys156