



## Estudio computacional de las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 presentes en el sitio activo de la proteasa 3CLpro

### Resumen

La proteína proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2 es una enzima crucial para la replicación viral, razón por la cual se convierte en un blanco terapéutico de gran importancia. El timol (2-isopropil-5-metilfenol), un compuesto natural que se encuentra en el tomillo (*Thymus vulgaris*), exhibe potencial actividad antiviral contra la proteasa 3CLpro. En este estudio, usando acoplamiento molecular con AutoDockTools-1.5.6, se evaluaron las energías de interacción molecular entre el timol y los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la proteína proteasa 3CLpro. Luego, con la teoría cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) y la de Interacciones no covalentes (NCI) se analizaron los tipos de interacciones moleculares entre los residuos de aminoácidos identificados y el timol. Los cálculos cuánticos se llevaron con el software Orca-5.0.3, utilizando el método DFT con el funcional M06-2X y el conjunto base aug-cc-pVDZ en fase gaseosa. Los resultados de acoplamiento molecular indican que el timol se une a la proteína 3CL con una energía de interacción igual a -3,784 kcal/mol. El análisis QTAIM indica la presencia de puntos críticos de enlace entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145. Además, se observa la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo OH del timol y el residuo CYS145, lo cual es corroborado por los análisis ELF (Electron Localization Function) y NCI (Non Covalent Interactions). Finalmente, el método NCI confirma la presencia de interacciones de Van der Waals con el residuo HIS41. Los resultados sugieren que el mecanismo de inhibición de la actividad de la proteína 3CLpro es controlado por interacciones moleculares tipo puente de hidrógeno e interacciones débiles.

**Palabras clave:** Acoplamiento molecular; enlace de hidrógeno; proteasa 3CL; residuos de aminoácidos; timol.

## Computational study of the molecular interactions between thymol and the HIS41 and CYS145 residues present in the active site of the 3CLpro protease

### Abstract

The protease 3CLpro of the SARS-CoV-2 is a crucial enzyme for viral replication, becoming a highly important therapeutic target. Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol), a naturally occurring compound found in thyme, exhibits potential antiviral activity against the 3CLpro protease. In this study, using molecular docking with AutoDockTools-1.5.6, the molecular interaction energies between thymol and amino acid residues in the active site of the protein protease 3CLpro were evaluated. Then, with the Atoms in Molecules (QTAIM) and Non-covalent Interactions (NCI) theories, the types of molecular interactions between identified amino acid residues and thymol were analyzed. Quantum calculations were carried out with the Orca-5.0.3 software using the DFT method with the M06-2X functional and the aug-cc-pVDZ basis set in the gas phase. The molecular docking results indicate that thymol is linked to the 3CL protein with an interaction energy equal to -3.784 kcal/mol. QTAIM analysis indicates the presence of critical binding sites between thymol and residues HIS41 and CYS145. In addition, the formation of a hydrogen bond between the OH group of thymol and the CYS145 residue is observed, which is corroborated by the ELF and NCI analyses. Finally, the NCI method confirms the presence of Van der Waals interactions with the HIS41 residue. The results suggest that the mechanism of inhibition of the activity of the 3CLpro protein is controlled by molecular interactions such as hydrogen bonding and weak interactions.

**Keywords:** Molecular docking; hydrogen bonding; protease 3CL; residues; thymol.

## Estudo computacional das interações moleculares entre o timol e os resíduos HIS41 e CYS145 presentes no sítio ativo da protease 3CLpro

### Resumo

A protease 3CLpro do SARS-CoV-2 é uma enzima crucial para a replicação viral, tornando-se um alvo terapêutico de grande importância. O timol (2-isopropil-5-metilfenol), um composto natural encontrado no tomilho, exibe potencial atividade antiviral contra a protease 3CLpro. Neste estudo, utilizando o docking molecular com o AutoDockTools-1.5.6, foram avaliadas as energias de interação molecular entre o timol e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da proteína protease 3CLpro. Em seguida, com a teoria quântica de átomos em moléculas (QTAIM) e da interações no-covalentes (NCI), foram analisados os tipos de interações moleculares entre os resíduos de aminoácidos identificados e o timol. Os cálculos quânticos foram realizados com o software Orca-5.0.3 usando o método DFT com o funcional M06-2X e a base aug-cc-pVDZ definida na fase gasosa. Os resultados do docking molecular indicam que o timol está ligado à proteína 3CL com uma energia de interação igual a -3.784 kcal/mol. A análise QTAIM indica a presença de sítios de ligação críticos entre o timol e os resíduos HIS41 e CYS145. Além disso, observa-se a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo OH do timol e o residuo CYS145, o que é corroborado pelas análises ELF e NCI. Finalmente, o método NCI confirma a presença das interações de Van der Waals com o residuo HIS41. Os resultados sugerem que o mecanismo de inibição da atividade da proteína 3CLpro é controlado por interações moleculares como ligações de hidrogênio e interações fracas.

**Palavras-chave:** Docking molecular; ligação de hidrogênio; protease; resíduos; timol.

## Introducción

El virus SARS-CoV-2 sorprendió a la humanidad por su facilidad de transmisión, cuyo mecanismo involucraba la difusión en el aire de pequeñas gotas expulsadas por las personas infectadas al respirar o toser. Este virus altamente infeccioso fue la causa principal de la enfermedad respiratoria denominada COVID-19 y en enero de 2020 fue declarada emergencia de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1], [2]. La estructura macromolecular del SARS-CoV-2 es compleja debido a sus diferentes componentes, que incluyen una envoltura lipídica, ARN y ciertas proteínas [3], [4]. Estas proteínas son las responsables de unirse al receptor ACE2 de las células humanas, lo cual provoca que el virus entre e infecte al huésped. La enzima que desempeña un papel crucial en la replicación del virus SARS-CoV-2 es la proteasa 3CL [5]. Esta proteasa facilita la hidrólisis de los enlaces peptídicos en más de 11 sitios de la poliproteína viral; se destacan los residuos HIS41 y CYS145 localizados en el sitio activo de la proteasa 3CL [5], [6]. Ambos residuos son críticos para la actividad catalítica de la proteasa, por lo que pueden ser utilizados como la diana catalítica en el tratamiento del SARS-CoV-2 [7].

El acoplamiento molecular (*molecular docking* en inglés) es una técnica de simulación molecular que ha permitido realizar estudios de la interacción molecular de compuestos químicos con sitios activos de proteínas específicas para determinar sus propiedades farmacéuticas [8], [9]. La interacción molecular efectiva entre un fármaco y un sitio activo tiene un impacto directo en la disminución, la replicación y proliferación de virus como el SARS-CoV-2. En el desarrollo de la pandemia, el tratamiento médico con productos naturales fue utilizado ampliamente como mecanismo preventivo del SARS-CoV-2. Sin embargo, en muchos casos, la identificación de los compuestos activos que producían la inhibición de la actividad de la proteína proteasa 3CL no fue realizada. En Latinoamérica, la planta de tomillo común (*Thymus vulgaris*) fue utilizada para el tratamiento del COVID-19. Esta planta contiene un aceite esencial formado por compuestos orgánicos mezclados con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales [10]. Para este aceite esencial obtenido del tomillo, el timol (2-isopropil-5-metilfenol) corresponde a una de las especies más importantes presentes en este aceite, con el cual se logró una recuperación favorable de pacientes con el padecimiento del COVID-19 (ver Figura 1). En otros estudios, la actividad de este compuesto fue evaluada y comparada con otros productos naturales como el carvacrol y la bis-demetoxi-curcumina [11]-[13]. En estos estudios, el timol mostró una buena actividad inhibidora, la cual estuvo asociada a su efectivo enlazamiento con la transmembrana proteasa serina 2 [12].

En el contexto planteado, para este trabajo se determinaron las energías de interacción molecular entre el timol y los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de la proteasa 3CL mediante acoplamiento molecular. A la vez, usando la teoría de átomos en moléculas (QTAIM por sus siglas en inglés) en combinación con la teoría de interacciones no covalentes (NCI por sus siglas en inglés), se analizaron los tipos de interacciones moleculares presentes entre los residuos de aminoácidos identificados y el compuesto orgánico 2-isopropil-5-metilfenol. Así mismo, otros estudios de acoplamiento molecular han sugerido que este compuesto químico puede interactuar con el sitio activo de la proteasa 3CL, especialmente con los residuos HIS41 y CYS145 [14]-[16]. Por lo tanto, la evaluación de los tipos de interacciones moleculares presentes entre estos residuos de aminoácidos y el timol es de gran importancia farmacéutica para comprender a nivel molecular el mecanismo de inhibición de este sitio activo presente en la proteína proteasa 3CL.

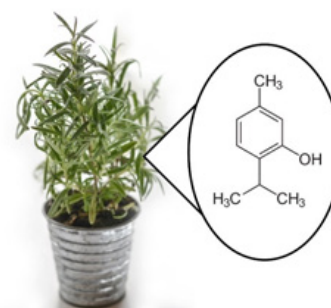


Figura 1. Planta de tomillo común (*Thymus vulgaris*).

## Materiales y métodos

### Preparación de la proteína proteasa 3CL y el compuesto timol (2-isopropil-5-metilfenol)

La estructura molecular de la proteasa 3CL fue obtenida de la base de datos RSCB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, PDB ID: 6LU7) en formato Protein Data Bank (PDB) [4]. Para preparar la proteasa 3CL para el acoplamiento molecular, se eliminaron las moléculas de agua y el inhibidor N3 utilizando el programa Chimera-1.16 [17]. La estructura resultante se guardó en formato PDB y se utilizó para realizar el acoplamiento molecular con el programa AutoDock Tools-1.5.6 [18]. Por otro lado, la estructura molecular del timol se obtuvo de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [19]-[21] en formato SDF. Para optimizar la estructura molecular del timol, se utilizó el programa Avogadro-1.2 [22] empleando el campo de fuerza MMFF94 [23]. Finalmente, las geometrías optimizadas se guardaron en formato \*.mol2 para su uso en el acoplamiento molecular.

### Acoplamiento molecular

Para el acoplamiento molecular se utilizaron los programas AutoDock-4.2.6 y AutoDock Tools-1.5.6 [18]. Se agregaron los hidrógenos esenciales y las cargas de Kollman a la proteína, y las cargas de Gasteiger al ligando utilizando AutoDock Tools-1.5.6 [18]. El sitio utilizado como objetivo para el acoplamiento molecular fue el que contiene los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL. Se colocó una celda de 40 Å de longitud usando las coordenadas XYZ: -10,977; 16,402; 67,709. Además, se utilizaron los parámetros del algoritmo genético [24] para realizar el acoplamiento molecular, utilizando 50 conformaciones y repitiendo el acoplamiento por triplicado. La energía de interacción molecular y la constante de inhibición se determinaron a partir de la conformación con la menor energía del complejo proteína-ligando.

### Cálculos cuánticos

Todos los cálculos cuánticos fueron realizados utilizando el programa Orca-5.0.3 [25], [26]. Los cálculos de energía se hicieron con el funcional M06-2X/ aug-cc-pVDZ en fase gaseosa para la molécula de timol con los residuos de la proteasa 3CLpro (HIS41 y CYS145). Además, se evaluaron las interacciones moleculares entre el compuesto y los residuos utilizando la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) [27], [28], la función de localización de electrones (ELF) [29], el método de gradiente reducido de la densidad (RDG por sus siglas en inglés) [30], [31] y el modelo de gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH) [32]. Por último, los cálculos de QTAIM, ELF, RDG e IGMH se realizaron con el programa Multiwfn-3.8 [33] empleando los archivos \*.wfn generados con el módulo orca\_2aim.

## Resultados y discusión

### Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se ha convertido en una herramienta valiosa para investigar la interacción entre una proteína y un compuesto denominado ligando, lo que la hace útil en el descubrimien-

to y diseño de fármacos [8], [9]. En este estudio se utilizó el método de acoplamiento molecular para evaluar la interacción entre la proteasa 3CL del SARS-CoV-2 y el timol, con el objetivo de determinar la energía de unión del complejo proteína-ligando y su constante de inhibición. Los resultados del estudio muestran que el timol se une con la región activa de la proteasa con una energía de unión de -15,833 (0,017) kJ/mol y una constante de inhibición de 1,29 (0,06) mM. Además, se observa la interacción molecular del timol con seis residuos de aminoácidos de la proteína: HIS41, LEU141, GLY143, SER144, CYS145 y HIS163 (ver Figura 3) mediante interacciones tipo enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

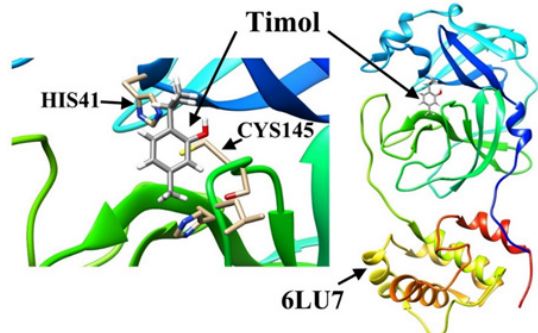


Figura 2. Acoplamiento molecular del timol con los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL del SARS-COV-2.

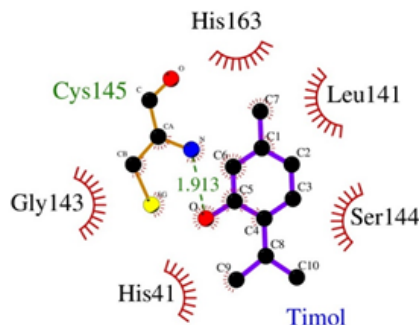


Figura 3. Interacción proteína-ligando de la proteasa 3CL con timol generado con el programa Ligplot+ v2.2.8.

Desde el punto de vista energético, la interacción molecular del timol en el sitio activo es más favorable comparado con compuestos sintéticos como el Paritaprevir y el Simeprevir que mostraron valor de energía de interacción de -8,80 kJ/mol y 8,78 kJ/mol, respectivamente [16]. Del mismo modo, el timol muestra un valor de constante de inhibición mayor a los reportados para estos compuestos (0,36  $\mu$ M para el Paritaprevir y 0,37  $\mu$ M). Sin embargo, estos valores sugieren una mayor concentración de timol para inhibir el sitio activo.

Los residuos HIS41, LEU141, GLY143, SER144, CYS145 y HIS163 corresponden a los aminoácidos que conforman uno de los sitios activos de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2. La presencia de los residuos HIS41, GLY143 y HIS163 es esencial para la actividad enzimática de la proteasa, mientras que el residuo LEU141 contribuye a la especificidad de los sustratos y la eficacia de los inhibidores [2], [34], [35]. Por su parte, el residuo SER144 actúa como nucleófilo en la reacción de hidrólisis de los sustratos. Por último, el resi-

duo CYS145 forma un enlace disulfuro con otro residuo de cisteína para estabilizar la estructura de la proteasa [36]. En general, estos residuos desempeñan un papel fundamental en la replicación del virus y son importantes para el desarrollo de terapias antivirales. Al observar la figura 3 podemos ver la formación de un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del timol y el residuo CYS145 (distancia igual a 1,913 Å), lo que sugiere que este ligando es específico para la inhibición de la proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2.

### Análisis QTAIM

La Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) desarrollada por Bader [27], [28] es una herramienta muy útil para comprender la estructura química y la reactividad a partir de la densidad electrónica ( $\rho(r)$ ), y también es utilizada para el análisis de interacciones no covalentes. La existencia de puntos críticos de enlace (BCP) entre los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CLpro con el timol sugiere la presencia de varias interacciones moleculares (ver Figura 4). Entre estas interacciones, las más destacadas son los enlaces de hidrógenos y las interacciones dispersivas tipo Van der Waals. La Tabla 1 muestra los parámetros topológicos evaluados. El signo del valor del Laplaciano de la densidad electrónica ( $\nabla^2\rho(r)$ ) permite evaluar el comportamiento de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace, y la densidad de energía total ( $H(r)$ ) permite evaluar la estabilidad de la interacción molecular [37], [38]. Estos valores son reportados en unidades atómicas (u.a.).

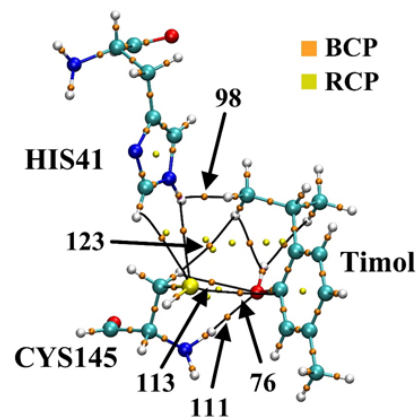


Figura 4. Grafos moleculares de los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL con el timol.

El análisis de los puntos críticos de enlace (BCP) permite identificar la naturaleza de la interacción molecular. Inicialmente, entre el timol y el residuo HIS41 se observa la formación de un punto crítico de enlace (BCP: 98) con un valor del Laplaciano electrónico de 0,0601 u.a. y una densidad de energía total igual a -0,0004 u.a. El Laplaciano electrónico al ser positivo indica una acumulación de densidad electrónica en el punto crítico, la cual es típica de enlaces covalentes. A su vez, este valor de  $H(r)$  indica una interacción molecular débil con una densidad electrónica a lo largo de la ruta de enlace baja (ver Figura 5) [28], [39], [40]. Esto sugiere que la interacción molecular, aunque presenta características covalentes, se asemeja más a una interacción molecular hidrógeno-hidrógeno muy débil entre estas moléculas [41].

Tabla 1. Parámetros topológicos obtenidos para la interacción entre el timol y la proteasa 3CL en unidades atómicas (u.a.).

Residuos	Átomos involucrados	Punto crítico	$\rho(r)$ (u.a.)	$\nabla^2\rho(r)$ (u.a.)	$G(r)$ (u.a.)	$V(r)$ (u.a.)	$H(r)$ (u.a.)
HIS41	R(N11-H12), L(H54-C30)	98	0,0212	0,0601	0,0155	-0,0159	-0,0004
CYS145	R(S19), L(C24)	76	0,0101	0,0308	0,0063	-0,0050	0,0014
	R(N13-H14)---L(O27)	111	0,0259	0,1036	0,0232	-0,0204	0,0027
	R(C18-H43), L(O27)	113	0,0096	0,0319	0,0074	-0,0068	0,0006
	R(C18-H43), L(H52-C30)	123	0,0041	0,0142	0,0028	-0,0020	0,0008

R: residuo, L: ligando.  
u.a.: Unidades atómicas.



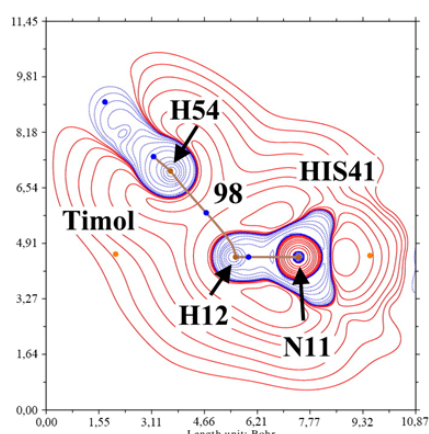


Figura 5. Mapa de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica en el punto crítico 98 (isovalor = 0,05).

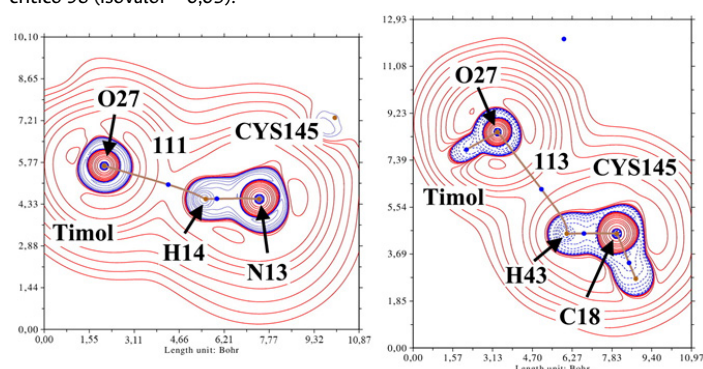


Figura 6. Mapas de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace 111 y 113 (isovalor = 0,05).

Por su parte, en la interacción molecular entre el timol y el residuo CYS145 se observan cuatro puntos críticos de enlace (BCP: 76, 111, 113 y 123). Todos estos puntos críticos presentan valores positivos de Laplaciano ( $\nabla^2\rho(r) > 0$ ), lo cual es indicativo de una dispersión de la densidad electrónica a lo largo de la ruta de enlace. Adicionalmente, los valores de energía total ( $H(r) > 0$ ) positivos son característicos de interacciones de capa cerrada (*closed-shell* en inglés), es decir, interacciones tipo enlaces iónicos, enlaces de hidrógenos y Van der Waals. Los valores del Laplaciano electrónico y la energía total en el punto crítico de enlace 111 confirman una interacción molecular efectiva entre el timol y el residuo CYS145 del tipo de enlace de hidrógeno. Como se puede observar en la Figura 6, la densidad electrónica del oxígeno asociada a los pares libres de electrones se orienta hacia el átomo de hidrógeno. Además, se observa la formación de un punto crítico de enlace entre el oxígeno del timol y el grupo -CH de la CYS145 (ver representación en la Figura 6). La magnitud de la energía total sugiere una interacción débil, del tipo Van der Waals. En este caso, el átomo de hidrógeno del grupo -CH actúa como un aceptor de electrones provenientes del átomo de oxígeno. Sin embargo, la naturaleza débil de este enlace se debe a la falta de un enlace covalente directo entre el hidrógeno y el oxígeno [42], [43]

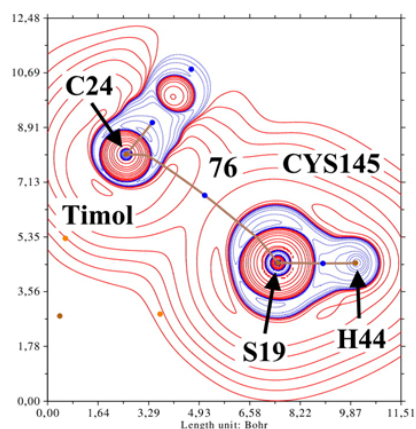


Figura 7. Mapas de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace 76 (isovalor = 0,05).

Adicionalmente, se observa la formación de un punto crítico de enlace entre el átomo de azufre del residuo CYS145 y un carbono del anillo aromático del timol (ver representación en la Figura 7). Los valores del Laplaciano electrónico y de la energía total sugieren una interacción covalente o parcialmente covalente de capa cerrada, debido a que los anillos aromáticos tienen densidades electrónicas altas como consecuencia de la deslocalización electrónica. Este hecho puede afectar la naturaleza y la fuerza de la interacción entre el átomo de azufre S19 y el átomo de carbono C24. Por otra parte, se observa la formación de un punto crítico de enlace entre un grupo -CH del timol y otro -CH del residuo CYS145 (ver Figura 8); este tipo de interacción es conocida como enlace de dihidrógeno y es muy similar al enlace de hidrógeno convencional, pero existe una fuerte interacción electrostática entre los átomos de hidrógenos con cargas parciales opuestas. Además, existe una contribución de fuerza de atracción de Van der Waals [44], [45]. El valor del Laplaciano electrónico obtenido de 0,0142 u.a. se encuentra dentro del rango reportado para este tipo de interacciones intermoleculares (0,014-0,139 u.a.) [46].

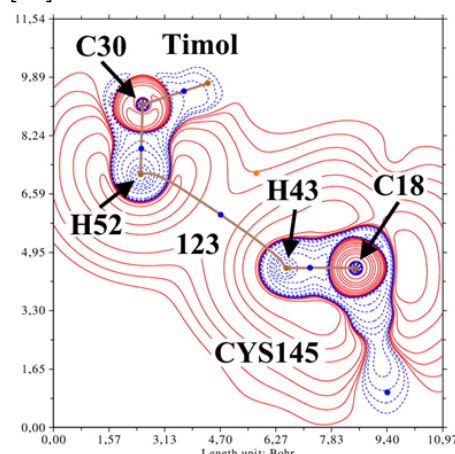


Figura 8. Mapas de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica CYS145 en el punto crítico de enlace 123 (isovalor = 0,05).

### Función de localización de electrones

La función de localización de electrones (ELF) es una herramienta útil para determinar la probabilidad de localizar pares de electrones. Además, ayuda a comprender el comportamiento de los electrones en un sistema molecular. En esta parte, el método ELF fue utilizado para el estudio de las interacciones entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL del virus SARS-CoV-2.

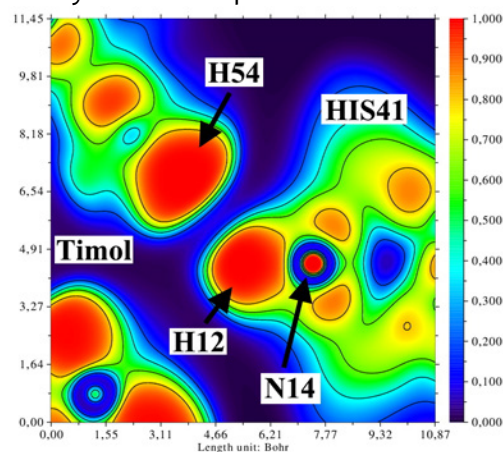
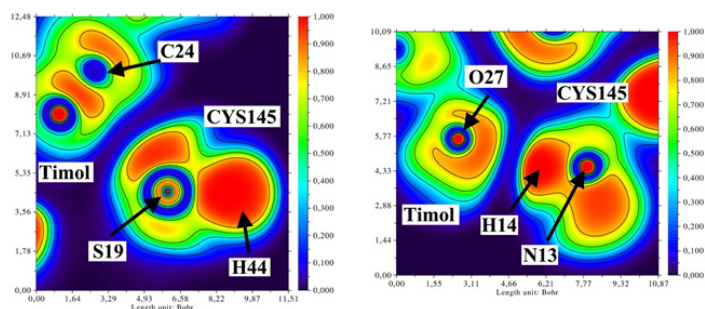


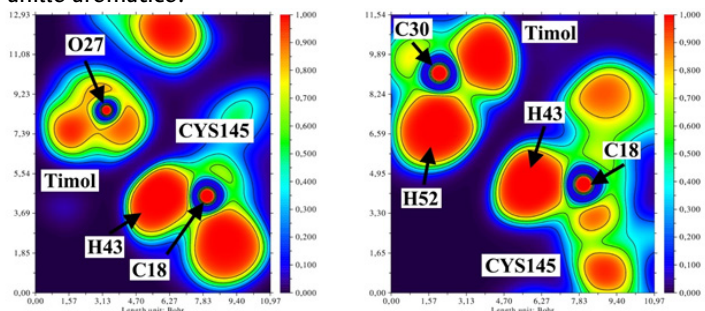
Figura 9. Mapa de contorno de la función de localización de electrones (isovalor = 0,85) para el H54 del timol con los átomos N14 y H12 del residuo HIS41.

En la Figura 9 se muestra el mapa ELF para la interacción molecular entre el timol y el residuo HIS41 en el plano para los átomos H54, H12 y N14. Este mapa revela zonas de color rojo asociadas a un carácter covalente, lo cual indica una alta localización de electrones, característica de un enlace covalente, lo que se correlaciona con lo obtenido por el análisis QTAIM.



**Figura 10.** Mapa de contorno de la función de localización de electrones (isovalor = 0,85) para el timol con los átomos S19 y H14 de la CYS145.

Por su parte, en la Figura 10 se presentan los mapas ELF para la interacción entre el timol (átomos C24 y O27) y el residuo CYS145 (átomos S19 y H14). En ambos casos se puede observar que los pares libres de electrones participan en la interacción molecular, tanto para el átomo de azufre (S19) como para el átomo de oxígeno (O27). Los pares de electrones libres del oxígeno están orientados hacia el átomo de hidrógeno del grupo amino de la CYS145. Este comportamiento es característico para la formación de un enlace de hidrógeno. Finalmente, para el átomo de carbono se observa que la distribución electrónica está influenciada por la naturaleza del anillo aromático.



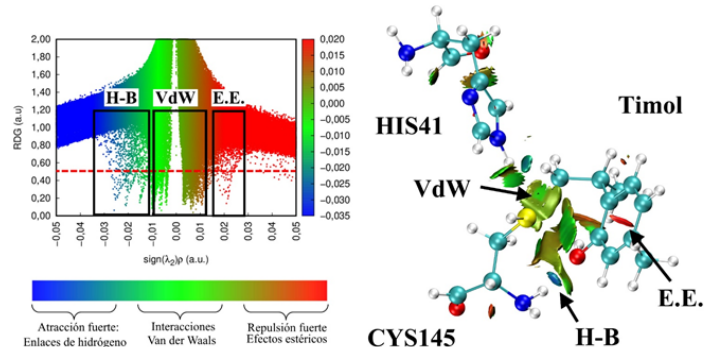
**Figura 11.** Mapa de contorno de la función de localización de electrones (isovalor = 0,85) para el timol con el átomo H43 de la CYS145.

En la Figura 11 se observan los mapas ELF para el timol (átomos O27 y H52) con el residuo CYS145 (átomo H43). En ambos casos se muestra que el átomo de hidrógeno del residuo CYS145 interviene en ambas interacciones moleculares. Adicionalmente, se observan zonas de alta concentración electrónica (color rojo) entre el hidrógeno H52 del timol y el H43 del residuo CYS145 característico de una interacción estérica no covalente hidrógeno-hidrógeno, lo cual corrobora lo observado para el Laplaciano electrónico en la Figura 8 con la presencia de un punto crítico de enlace entre el H52 del timol y el H43 del residuo CYS145 [41].

### Método de gradiente reducido de la densidad (RDG)

En el análisis de interacción no covalente, uno de los métodos más utilizados es el gradiente reducido de la densidad (RDG por sus siglas en inglés); este método fue desarrollado por Johnson *et al.* [30], [31] y permite obtener la representación de las interacciones de enlaces de hidrógenos (H-B), Van der Waals (VdW) y efectos estéricos (E.E.). Adicionalmente, este método distingue las interacciones débiles como áreas de baja densidad electrónica y bajos gradientes de densidad reducida, por lo cual a partir de la isosuperficie RDG podemos identificar las diferentes regiones de interacción intermolecular simplemente examinando sus colores [47]. En el gráfico 2D de la Figura 12, la zona azul indica la presencia de interacciones no covalentes fuertes y atractivas como los enlaces de hidrógenos, la zona roja señala la presencia de interacciones repulsivas como efectos estéricos y la zona verde muestra la presencia de interacciones débiles como interacciones débiles de Van der Waals.

En la Figura 12 se observa una isosuperficie de color azul ubicada entre el átomo de oxígeno del timol y el grupo N-H del residuo CYS145, lo cual indica la presencia de un enlace de hidrógeno. Por su parte, los valores de signo ( $\lambda_2$ ) $\rho$  permiten determinar la natura-

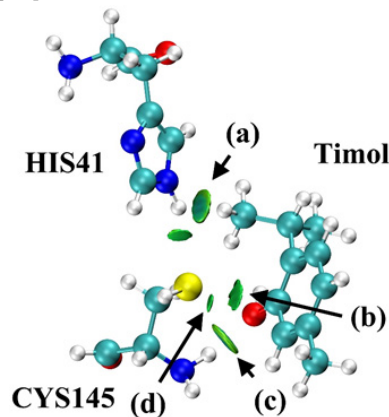


**Figura 12.** Gráfico 2D e isosuperficie de gradiente reducido de la densidad (isovalor = 0,85) para la interacción del timol con los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2.

leza de las interacciones moleculares. Aquí se observó que el enlace de hidrógeno (H-B) está comprendido entre -0,030 u.a. < signo( $\lambda_2$ ) $\rho$  < -0,020 u.a., mientras que las interacciones moleculares de Van der Waals (isosuperficie de color verde), en un rango entre -0,010 u.a. < signo( $\lambda_2$ ) $\rho$  < 0,010 u.a. Además, las isosuperficies de color rojo indican el efecto estérico que se encuentra en el anillo aromático del timol, lo que resulta en una fuerte repulsión. Estas interacciones repulsivas se observaron dentro de 0,020 u.a. < signo( $\lambda_2$ ) $\rho$  < 0,030 u.a.

### Modelo de gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH)

El modelo de gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH) permite calcular la densidad electrónica y el gradiente de la densidad electrónica de una molécula, basado en la partición de Hirshfeld, el cual consiste en dividir la densidad electrónica de la molécula en fragmentos atómicos [32], [47]. Adicionalmente, con este modelo se pueden visualizar y cuantificar las interacciones intermoleculares e intramoleculares. De allí, la importancia para el estudio de las interacciones entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145. Uno de los parámetros por obtener a través de este modelo es el índice intrínseco de la fuerza de enlace para interacciones débiles (IBSIW) que permite cuantificar las fuerzas de las interacciones formadas [48].



**Figura 13.** Isosuperficie IGMH para la interacción entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CLpro.

**Tabla 2.** Índices intrínsecos de la fuerza de enlace obtenidos para las interacciones entre el timol y los residuos.

Residuos	Átomos involucrados	#	IBSIW (u.a.)
HIS41	R(N11-H12), L(H54-C30)	(a)	1,2848
CYS145	R(S19), L(C24)	(b)	0,4984
	R(N13-H14), L(O27)	(c)	1,6519
	R(C18-H43), L(O27)	(d)	0,4317

R: residuo, L: ligando.

Como se puede observar en la Figura 13, el análisis IGMH revela cuatro interacciones entre el timol y los residuos de la proteasa 3CL. Las zonas de color azul revelan una alta concentración de densidad electrónica característica de enlaces de hidrógeno; por su parte, las

zonas de color rojo señalan una baja densidad electrónica. Los valores de IBSIW permiten ordenar en función de la fuerza de la interacción; el enlace de hidrógeno formado entre la CYS145 y el timol es el de mayor magnitud, lo cual indica una fuerte interacción.

## Conclusiones

Se emplearon métodos computacionales para analizar las interacciones moleculares entre el timol y los residuos clave en el sitio activo de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos a través del acoplamiento molecular revelaron que el timol se une al sitio activo de la 3CLpro, con una energía de interacción de -3,784 kcal/mol y una constante de inhibición de 1,29 mM. El mapeo de las interacciones mostró la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos HIS41, LEU141, GLY143, SER144, CYS145 e HIS163.

Asimismo, se caracterizaron las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 utilizando las teorías QTAIM, ELF, RDG e IGMH. Estas teorías permitieron identificar la presencia de enlaces de hidrógeno y otras interacciones no covalentes. El análisis QTAIM mostró puntos críticos de enlace y la existencia de un enlace de hidrógeno entre el grupo OH del timol y el residuo CYS145 con valores de Laplaciano y densidad de energía total de 0,01036 y 0,0027 u.a. Además, ELF reveló cómo los pares de electrones libres en el oxígeno se orientan hacia el hidrógeno en CYS145, lo que favorece la formación del enlace de hidrógeno.

Finalmente, los análisis de RDG e IGMH para las interacciones no covalentes confirmaron la presencia de la formación del enlace de hidrógeno entre el timol y la CYS145 y la presencia de interacciones del tipo Van der Waals con la HIS41. Adicionalmente, en la formación de estas diversas interacciones el timol puede unirse de forma efectiva con los residuos CYS145 y HIS41 localizados en la región activa de la proteasa 3CLpro.

## Referencias

- [1] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z.-L. Shi, "Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19", *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. 3, art. no. 3, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- [2] I. Antonopoulou, E. Sapountzaki, U. Rova, and P. Christakopoulos, "Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature's toolbox of bioactive compounds", *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 20, pp. 1306-1344, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.009>.
- [3] Q. Peng et al., "Structural Basis of SARS-CoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir", *Innovation (Camb)*, vol. 2, no. 1, p. 100080, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100080>.
- [4] Z. Jin et al., "Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors", *Nature*, vol. 582, no. 7811, art. no. 7811, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
- [5] Z. Jin et al., "Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur", *Nat Struct Mol Biol*, vol. 27, no. 6, art. no. 6, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0440-6>.
- [6] L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, and A. D. Andricopulo, "Molecular docking and structure-based drug design strategies", *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 13384-13421, Jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [7] L. Pinzi and G. Rastelli, "Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery", *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 18, p. 4331, Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- [8] M. T. López Luengo, "Tomillo", *Offarm*, vol. 25, no. 1, pp. 74-77, Jan. 2006.
- [9] A. Kowalczyk, M. Przychodna, S. Sopata, A. Bodalska, and I. Fecka, "Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications", *Molecules*, vol. 25, no. 18, p. 4125, Sep. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>.
- [10] A. Marchese et al., "Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature", *Food Chem*, vol. 210, pp. 402-414, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>.
- [11] P. Kumar Yadav, A. Jaiswal, and R. Kumar Singh, "In silico study on spice-derived antiviral phytochemicals against SARS-CoV-2 TMPRSS2 target", *J Biomol Struct Dyn*, vol. 40, no. 22, pp. 11874-11884, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1965658>.
- [12] P. Umadevi, S. Manivannan, A. M. Fayad, and S. Shelvy, "In silico analysis of phytochemicals as potential inhibitors of proteases involved in SARS-CoV-2 infection", *J Biomol Struct Dyn*, vol. 40, no. 11, pp. 5053-5059, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1866669>.
- [13] S. Ali et al., "Natural products can be used in therapeutic management of COVID-19: Probable mechanistic insights", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 147, p. 112658, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112658>.
- [14] B. Salehi et al., "Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses", *Phytother Res*, vol. 32, no. 9, pp. 1688-1706, Sep. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>.
- [15] J. C. Ferreira, S. Fadl, A. J. Villanueva, and W. M. Rabeh, "Catalytic dyad residues His41 and Cys145 impact the catalytic activity and overall conformational fold of the main SARS-CoV-2 protease 3-chymotrypsin-like protease", *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, p. 692168, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.692168>.
- [16] M. A. Alamri et al., "Pharmacoinformatics and molecular dynamics simulation studies reveal potential covalent and FDA-approved inhibitors of SARS-CoV-2 main protease 3CLpro", *J Biomol Struct Dyn*, vol. 39, no. 13, pp. 4936-4948, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1782768>.
- [17] E. F. Pettersen et al., "UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis", *J Comput Chem*, vol. 25, no. 13, pp. 1605-1612, Oct. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [18] G. M. Morris et al., "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility", *J Comput Chem*, vol. 30, no. 16, pp. 2785-2791, Dec. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [19] S. Kim, "Getting the most out of PubChem for virtual screening", *Expert Opin Drug Discov*, vol. 11, no. 9, pp. 843-855, Sep. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1216967>.
- [20] S. Kim et al., "PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces", *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. D1, pp. D1388-D1395, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>.
- [21] S. Kim et al., "PubChem 2023 update", *Nucleic Acids Research*, vol. 51, no. D1, pp. D1373-D1380, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>.
- [22] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. R. Hutchison, "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform", *Journal of Cheminformatics*, vol. 4, no. 1, p. 17, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [23] T. A. Halgren, "Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 17, no. 5-6, pp. 490-519, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P).
- [24] E. J. Gardiner, P. Willett, and P. J. Artymiuk, "Protein docking using a genetic algorithm", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 44, no. 1, pp. 44-56, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/prot.1070>.
- [25] F. Neese, "The ORCA program system", *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 2, no. 1, pp. 73-78, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.81>.



- [26] F. Neese, "Software update: The ORCA program system-Version 5.0", *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 12, no. 5, p. e1606, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.1606>.
- [27] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*. In *International Series of Monographs on Chemistry*. Oxford, New York: Oxford University Press, 1994.
- [28] J. Hernández-Trujillo and R. F. W. Bader, "Properties of Atoms in Molecules: Atoms Forming Molecules", *J. Phys. Chem. A*, vol. 104, no. 8, pp. 1779-1794, Mar. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp994096z>.
- [29] A. D. Becke and K. E. Edgecombe, "A simple measure of electron localization in atomic and molecular systems", *J. Chem. Phys.*, vol. 92, no. 9, pp. 5397-5403, May 1990. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.458517>.
- [30] E. R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A. J. Cohen, and W. Yang, "Revealing Noncovalent Interactions", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 18, pp. 6498-6506, May 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja100936w>.
- [31] M. T. Alotaibi, "Noncovalent interaction stabilizes the 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives over g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> surface to enhance optical properties: Synthesis, characterization, and DFT investigation", *Journal of Molecular Structure*, vol. 1214, p. 128192, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128192>.
- [32] T. Lu and Q. Chen, "Independent gradient model based on Hirshfeld partition: A new method for visual study of interactions in chemical systems", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 43, no. 8, pp. 539-555, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.26812>.
- [33] T. Lu and F. Chen, "Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 33, no. 5, pp. 580-592, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>.
- [34] W. Dai et al., "Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease", *Science*, vol. 368, no. 6497, pp. 1331-1335, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb4489>.
- [35] D. Kumar, V. Chandel, S. Raj, and B. Rath, "In silico identification of potent FDA approved drugs against Coronavirus COVID-19 main protease: A drug repurposing approach", *Chemical Biology Letters*, vol. 7, no. 3, art. no. 3, Mar. 2020. <http://pubs.iscience.in/journal/index.php/cbl/article/view/1033>
- [36] L. Zhang et al., "Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors", *Science*, vol. 368, no. 6489, pp. 409-412, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>.
- [37] H. Yang, P. Boulet, and M.-C. Record, "A rapid method for analyzing the chemical bond from energy densities calculations at the bond critical point", *Computational and Theoretical Chemistry*, vol. 1178, p. 112784, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2020.112784>.
- [38] R. Hilal, S. G. Aziz, A. O. Alyoubi, and S. Elroby, "Quantum Topology of the Charge Density of Chemical Bonds. QTAIM Analysis of the C-Br and O-Br Bonds", *Procedia Computer Science*, vol. 51, pp. 1872-1877, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.05.423>.
- [39] R. W. Gora, S. J. Grabowski, and J. Leszczynski, "Dimers of Formic Acid, Acetic Acid, Formamide and Pyrrole-2-carboxylic Acid: An Ab Initio Study", *J. Phys. Chem. A*, vol. 109, no. 29, pp. 6397-6405, Jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp044072e>.
- [40] M. Zahedi-Tabrizi, S. F. Tayyari, F. Badalkhani-Khamseh, R. Ghomi, and F. Afshar-Qahremani, "Molecular structure and intramolecular hydrogen bonding in 2-hydroxybenzophenones: A theoretical study", *J Chem Sci*, vol. 126, no. 4, pp. 919-929, Jul. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12039-014-0651-7>.
- [41] C. F. Matta, J. Hernández-Trujillo, T. H. Tang, and R. F. Bader, "Hydrogen-hydrogen bonding: a stabilizing interaction in molecules and crystals", *Chemistry-A European Journal*, vol. 9, no. 9, pp. 1940-1951, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.200204626>.
- [42] G. R. Desiraju, "The C-H...O Hydrogen Bond: Structural Implications and Supramolecular Design", *Acc. Chem. Res.*, vol. 29, no. 9, pp. 441-449, Sep. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar950135n>.
- [43] Y. Gu, T. Kar, and S. Scheiner, "Fundamental Properties of the CH...O Interaction: Is It a True Hydrogen Bond?", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 40, pp. 9411-9422, Oct. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja991795g>.
- [44] D. J. Wolstenholme, J. Flogeras, F. N. Che, A. Decken, and G. S. McGrady, "Homopolar Dihydrogen Bonding in Alkali Metal Amidoboranes: Crystal Engineering of Low-Dimensional Molecular Materials", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 7, pp. 2439-2442, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja311778k>.
- [45] N. Mohan, A. Varela-Álvarez, C. V. Ramana, and S. Sirimulla, "Computational Study of the C-H...H-C Contacts in Valine-Methane Complexes", *ChemRxiv*, Apr. 15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14418869.v1>.
- [46] P. L. A. Popelier, "Characterization of a Dihydrogen Bond on the Basis of the Electron Density", *J. Phys. Chem. A*, vol. 102, no. 10, pp. 1873-1878, Mar. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp9805048>.
- [47] C. Lefebvre, G. Rubez, H. Khartabil, J.-C. Boisson, J. Contreras-García, and E. Hénon, "Accurately extracting the signature of intermolecular interactions present in the NCI plot of the reduced density gradient versus electron density", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 27, pp. 17928-17936, Jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7CP02110K>.
- [48] J. Klein, H. Khartabil, J.-C. Boisson, J. Contreras-García, J.-P. Piquemal, and E. Hénon, "New Way for Probing Bond Strength", *J. Phys. Chem. A*, vol. 124, no. 9, pp. 1850-1860, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b09845>.

**Citación del artículo:**

J. G. González A., P. Iza, J. G. Parra, "Estudio computacional de las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 presentes en el sitio activo de la proteasa 3CLpro", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 42-48, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.110606>