

Estudo *in silico* da atividade anti-inflamatória do extrato de calêndula baseado no receptor do GABAA por inibição endógena.

Miguel Manuel Cassoma,^{1, } Maria Imaculada Lourenço Meiru,^{1, } Aluisio Marques da Fonseca,^{2, }*

¹Institute of Exact Sciences and Nature, University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, ZIP 62790970, Redenção, CE, Brazil.; Mcassoma380@gamil.com; imaculadameiru@gmail.com

²Academic Master in Sociobiodiversity and Sustainable Technologies, Institute of Engineering and Sustainable Development, University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, Auroras Campus, CEP: 62790970, Redenção, CE, Brazil; aluisionmf@unilab.edu.br ;

✉ Aluisio Marques da Fonseca*
aluisionmf@unilab.edu.br

Resumo

A prevenção de inflamações diversas impacta significativamente tanto nos custos financeiros do Sistema Único de Saúde (SUS) quanto na qualidade de vida dos indivíduos. Dentro deste contexto, destaca-se a fitoterapia, na qual diversas plantas medicinais apresentam propriedades anti-inflamatórias. Entre essas plantas, encontra-se a *Calêndula officinalis*, uma herbácea anual que varia entre 30 a 70 cm de altura e é moderadamente pilosa. Frequentemente encontrada em jardins, apresenta variações de tamanho, cores que vão do branco-amarelado ao laranja escuro, e desenvolvimentos variados da corola. Cultivada durante períodos quentes em solos leves, esta planta cresce rapidamente e floresce por longos períodos. Seus compostos florais são popularmente reconhecidos por suas propriedades calmantes naturais para a pele, além de ações antimicrobianas, calmantes e cicatrizantes. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de simulação computacional de 23 compostos presentes no extrato de calêndula com potencial ação anti-inflamatória. Trata-se de um estudo teórico, onde os objetos ou produtos são submetidos a procedimentos que podem ser influenciados por certas variáveis em condições controladas. Utilizou-se, na composição do estudo, o extrato glicólico das flores de *Calêndula officinalis*. Após a simulação, observou-se que três componentes do extrato apresentaram resultados favoráveis ao receptor GABAA, que é responsável pela ação anti-inflamatória e utilizado em modelos de inflamação e ansiedade. Os compostos identificados foram anteraxantina (CID5281223), com energia de afinidade de -8.2 kcal/mol; violaxantina (CID448438), com energia de afinidade de -8.0 kcal/mol; e luteína (CID5368396), com valor de afinidade de -7.7 kcal/mol. Em comparação, o Diazepam apresentou uma energia de afinidade de -6.3 kcal/mol. Esses resultados indicam que todos os compostos estudados possuem energias de afinidade mais estáveis do que o ligante de referência, o que pode justificar sua ação inibitória e direcionar futuros ensaios experimentais para comprovação.

Palavras-chave: *Calêndula officinalis*, anti-inflamatório, docking molecular.

Abstract

The prevention of various inflammations significantly impacts the financial costs of the Unified Health System (SUS) and the quality of life of individuals. Within this context, phytotherapy stands out, as several medicinal plants have anti-inflammatory properties. Among these plants is *Calendula officinalis*, an annual herbaceous plant that ranges from 30 to 70 cm in height and is moderately hairy. Often found in gardens, it presents variations in size, colors ranging from yellowish-white to dark orange, and varied corolla developments. This plant proliferates during warm periods in mild soils and blooms for long periods. Its floral compounds are popularly recognized for their natural soothing properties for the skin and antimicrobial, relaxing, and healing actions. In this context, this work aimed to conduct a computational simulation study of the composition of calendula extract with the aim of its anti-inflammatory action. It is a theoretical study where objects or products are subjected to procedures that can be influenced by certain variables under controlled conditions. The glycolic extract of *Calendula officinalis* flowers was used in the study's composition. After the simulation, it was observed that three components of the extract showed favorable results for the GABAA receptor, which is responsible for the anti-inflammatory action and is used in models of inflammation and anxiety. The compounds identified were anthraxanthine (CID5281223), with an affinity energy of -8.2 kcal/mol; violaxanthin (CID448438), with an affinity energy of -8.0 kcal/mol; and lutein (CID5368396), with an affinity value of -7.7 kcal/mol. In comparison, diazepam had an affinity energy of -6.3 kcal/mol. These results indicate that all the compounds studied have more stable affinity energies than the reference ligand, which may justify their inhibitory action and direct future experimental assays for proof.

Key Words: *Calendula officinalis*, anti-inflammatory, molecular docking study.

1. INTRODUÇÃO

Na antiguidade muito antes do surgimento da escrita, os homens já usavam as ervas para fins medicinais, mesmo sem terem conhecimento científico sobre elas, na atualidade as plantas medicinais são bastante utilizadas por uma boa parte da população como um recurso medicinal alternativo para tratamento de diversas doenças (Petrovska 2012; Nadaf et al. 2023).

A calêndula (*Calêndula officinalis* L.) é uma planta herbácea anual (Fig. 1), pertencente à família Asteraceae, nativa do Mediterrâneo, conhecida desde a antiguidade pelas propriedades medicinais em suas flores (Mishra et al. 2018) geralmente cultivadas por egípcios, gregos, hindus e árabes, a calêndula cresceu em jardins europeus (Carvalho et al. 2018). Esta espécie desenvolve facilmente no sul do Brasil devido às condições climáticas por serem favoráveis ao seu desenvolvimento (Gazim et al. 2008). Possui propriedades anti-inflamatórias, antifúngicas, antialérgicas, calmantes, cicatrizantes e tonificantes para a pele podendo ser utilizado no tratamento de diversas doenças que afetam a pele como acne, psoríase, queimaduras, pele rachada, coceira, dermatite, afta, entre outros (Barrera et al. 2018; Hassan and Abd El-latif 2018; Ameen et al. 2020; Valarmathi et al. 2020). Esses benefícios podem ser alcançados quando aplicados topicamente ou por via oral.

As partes do calêndula consideradas terapêuticas são as folhas e flores, que podem ser laranja-amareladas, esverdeadas ou amarelos com centro avermelhado. Os extratos de calêndula também podem ser incorporados em formulações cosméticas que auxiliam no tratamento da acne utilizando concentrações que variam de 2 a 5 % como padrão (Rădulescu et al. 2000; Rigane et al. 2013).

Figura 1. *Calêndula officinalis* L.



Fonte: Horto didático (2020)

Ao passar do tempo vem se registrado várias técnicas e procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais, embora a medicina alopática tenha crescido significativamente desde a segunda metade do século XX, permanecem barreiras fundamentais à sua utilização pelas populações necessitadas, desde o acesso a centros de cuidados hospitalares até ao acesso a testes e medicamentos. Estas razões, aliadas à fácil disponibilidade de plantas medicinais e à grande tradição de utilização das mesmas, contribuem para a sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento. Atualmente, grande parte das vendas de plantas medicinais ocorre em farmácias e lojas de produtos naturais, sendo as preparações botânicas vendidas sob rótulos industriais (Yuan et al. 2016; Lima Melro et al. 2020).

Os produtos naturais são compostos químicos produzidos por organismos vivos, como plantas, fungos e bactérias. Muitas vezes, esses produtos desempenham papéis importantes na defesa contra predadores e interespecies. Os metabólitos secundários são um subconjunto desses produtos naturais e geralmente não são essenciais para o crescimento ou desenvolvimento direto do organismo que os produz, mas têm efeitos biológicos em outras espécies (Divekar et al. 2022).

As simulações computacionais têm sido cada vez mais utilizadas para estudar a estrutura e as propriedades dos produtos naturais e seus metabólitos secundários. Por exemplo, a modelagem molecular pode ser usada para prever a estrutura tridimensional de uma molécula com base em sua composição química e interações intermoleculares. Isso é útil para entender como os produtos naturais interagem com proteínas e outros alvos biológicos em nível molecular (de Sousa et al. 2021). Além disso, simulações computacionais podem ser usadas para prever a atividade biológica dos produtos naturais, identificar potenciais alvos terapêuticos e otimizar sua estrutura para melhorar a eficácia ou reduzir os efeitos colaterais (Vora et al. 2023). Por exemplo, o docking molecular é uma técnica computacional que pode ser usada para prever como uma molécula se encaixa em um sítio ativo de uma proteína alvo, ajudando a identificar compostos com potencial atividade terapêutica (Meng et al. 2012). Portanto, a correlação entre produtos naturais, metabólitos secundários e simulações computacionais é uma área de pesquisa promissora que pode levar à descoberta de novos medicamentos, pesticidas e outros produtos bioativos, bem como fornecer insights sobre os processos biológicos subjacentes à produção dessas substâncias na natureza. A docagem molecular é um dos métodos principais de SBDD (Design de Medicamentos Baseado em Estrutura) empregados em estudos de química medicinal. Esta técnica envolve a previsão da conformação bioativa de uma micromolécula (ligante) no local de ligação de uma

macromolécula (como uma enzima, receptor, DNA ou RNA), seguida pela avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (Guido and Andricopulo 2008).

A técnica de docagem molecular foi introduzida nos primeiros anos da década de 80 e teve um impacto significativo tanto na fase inicial de descoberta de novas moléculas bioativas quanto na etapa de otimização de compostos líderes em relação a diversas propriedades, como potência, afinidade e farmacocinética, entre outras. Um dos principais desafios no SBDD é a escolha do programa de docagem molecular adequado. Os métodos disponíveis fundamentam-se em conceitos que apresentam pequenas diferenças entre si, tornando um programa específico mais apropriado para determinados projetos.

Um dos progressos significativos no desenvolvimento e pesquisa de novos medicamentos envolve a aplicação da modelagem molecular. Essa abordagem consolidou-se como uma ferramenta essencial não apenas na fase inicial da descoberta de novos fármacos, mas também na melhoria de um protótipo já existente, seja ele obtido através de estudos de modelagem molecular ou por outros meios (Singh et al. 2023).

Assim, o objeto de estudo dessa pesquisa é descrever a eficácia do extrato de calêndula como anti-inflamatório, e desenvolver modelos moleculares que representem as estruturas químicas dos componentes ativos presentes na calêndula. Realizar através de simulações computacionais para investigar as interações específicas entre os compostos da calêndula e as proteínas, enzimas ou outras moléculas associadas à resposta inflamatória.

2. METODOLOGIA

2.1 Detalhes Computacionais

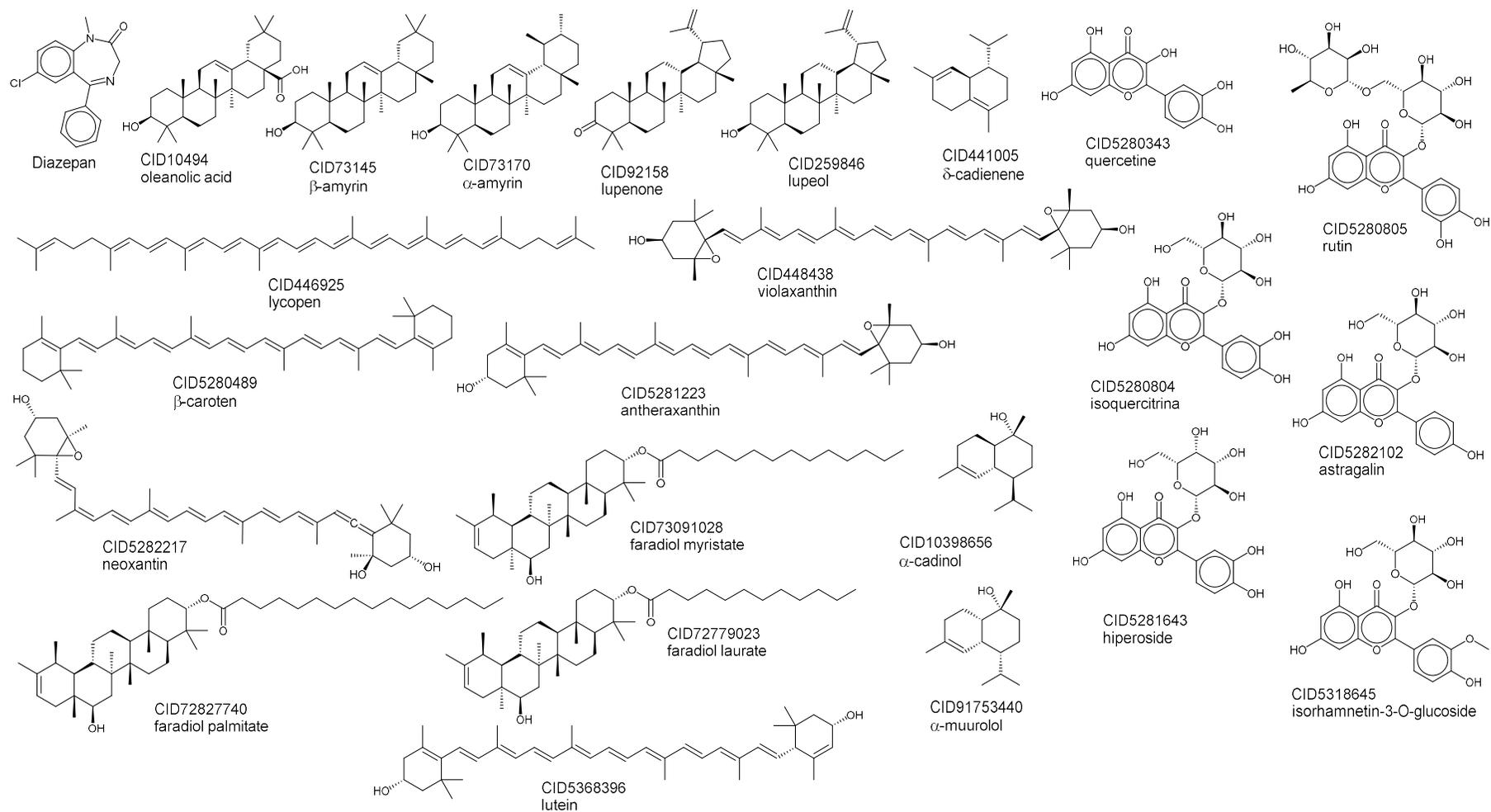
Para a realização das simulações, os códigos utilizados foram: MarvinSketch TM 19.12.0 (<http://www.chemaxon.com>) (Csizmadia 2019), Avogadro TM (<http://avogadro.cc/>) (Hanwell et al. 2012), Autodocktools TM (Huey et al. 2012), AutoDockVina TM (Trott e Olson 2010), UCSF Chimera TM (Pettersen et al. 2004), Discovery studio visualizer TM viewer (Biovia 2016) e Pymol (DeLano 2020).

2.2. Projeto e otimização de ligantes

As estruturas químicas dos produtos naturais encontrados no extrato de calêndula foram desenhadas usando o código ACD/ChemSketch (<https://www.acdlabs.com/products/chemsketch/>), parametrizada em pH fisiológico (Figura 2), e os conformadores de menor energia foram otimizados usando o código Avogadro (Hanwell et al. 2012), configurado para usar o algoritmo de descida mais foram feitos 50 iterações aplicando o campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field) (Halgren 1996; Neto et al., 2021).

Figura 02. Estruturas 2D dos compostos químicos selecionados neste estudo desenhadas no software ACD/ChemSketch versão 2022

(<https://www.acdlabs.com/products/chemsketch/>).



Fonte: Autor (2024)

2.3. Procedimentos gerais do docking molecular

Para avaliar o mecanismo de ação dos ligantes que fazem parte da composição do extrato da calêncula contra o receptor GABAA, foram realizadas simulações de acoplamento molecular, com as estruturas dos receptores obtidas do repositório do Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), identificadas como "CryoEM structure of human full-length alpha1beta3gamma2L GABAAR in complex with diazepam (Valium), GABA and megabody Mb38" (PDB 6HUP) (Masiulis et al. 2019). A preparação das estruturas proteicas foi realizada utilizando o código AutoDockTools (Morris et al. 2009), onde resíduos foram removidos e adicionados às cargas de Gasteiger e átomos polares de hidrogênio (Yan et al. 2014; Silva Mendes et al., 2022).

As simulações de acoplamento molecular foram realizadas utilizando o código AutoDockVina (Trott e Olson 2010), configurado para executar o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) e exaustividade 64 (Marinho et al. 2020). Cinquenta simulações independentes foram realizadas utilizando uma grade de simulação centrada no alvo para envolver toda a estrutura da proteína com os eixos: 125.281 (x), 139.534 (y) e 136.018 (z), parâmetros de tamanho 126Å (x), 100Å (y) e 126Å (z) com o receptor GABAA. Para validar as simulações de docking, a técnica de redocking foi realizada com o medicamento Diazepam (DZP) (Silva Mendes et al. 2022) cocristalizado no GABAA.

O parâmetro estatístico RMSD (Root Mean Square Deviation) com valores até 2,0 Å (Yusuf et al. 2008) e energia de afinidade, com valores inferiores a -6,0 kcal/mol (Shityakov e Förster 2014; Silva et al., 2021), e a energia de afinidade também foi utilizada para avaliar a estabilidade dos complexos formados. Utilizando os valores das distâncias entre os átomos doador e receptor, avaliou-se a intensidade das ligações de Hidrogênio (H-Bond) classificadas como ligações fortes quando apresentam distâncias entre 2,5-3,1 Å, ligações médias entre 3,1-3,55 Å e ligações fracas quando apresentam comprimento maior que 3,55 Å (Rose et al. 2018).

2.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores médios \pm erro padrão da média para cada valor obtido. Após a confirmação da distribuição normal e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA one-way) e ANOVA two-way nos experimentos com antagonistas, seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism v.8.0. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo *in silico*

Com base na docagem molecular realizada pelo Autodock Vina (Trott & Olson, 2010), foi possível verificar as energias de afinidade (kcal/mol) e correlacionar o desvio quadrático médio entre o receptor ligante (RMSD) contra a proteína eceptora do GABAA, especialmente antheraxantina, violaxantina e pôr fim a luteína com energias de afinidade de -8,2 kcal/mol, -8,0 e -7,7 kcal/mol, respectivamente, evidenciando competitividade com o ligante de referência (Diazepan®), que se mostrou com estabilidade inferior, com energia de afinidade de -6.3 kcal/mol, conforme mostra a tabela abaixo.

Tabela 01. Dados de energia, poses e desvio quadrático médio dos compostos frente ao acoplamento molecular composição fitoquímica do extrato de calêndula.

Nome	Código PUBCHEM	Energia de afinidade (kcal/mol)
Antheraxanthin	CID5281223	-8.2
violaxanthin	CID448438	-8.0
Lutein	CID5368396	-7.7
neoxantin	CID5282217	-7.6
betacaroten	CID5280489	-7.6
betaamyryn	CID73145	-7.6
lupenone	CID92158	-7.5
Lupeol	CID259846	-7.2
hiperosídeo	CID5281643	-7.2
oleanolicacid	CID10494	-7.1
astragalina	CID5282102	-7.1
lycopen	CID446925	-7.0
isoquercitrina	CID5280804	-7.0
Rutin	CID5280805	-7.0
alfaamyryn	CID73170	-7.0

isorhamnetin3Oglucoside	CID5318645	-6.6
quercetina	CID5280343	-6.5
Diazepam®		-6.3
Faradiolpalmitate	CID72827740	-6.2
Faradiollaurate	CID72779023	-5.8
deltacadienene	CID441005	-5.6
Faradiolmyristate	CID73091028	-5.6
alphamurolol	CID91753440	-5.4
alfacadinol	CID10398656	-5.3

Fonte: Autor (2024)

Inicialmente, o RMSD (Root-Mean-Square Deviation) foi utilizado para validação estatística dos resultados das simulações de formação de complexos e escolha da melhor pose. O RMSD é calculado com base na medida da distância média entre os átomos dos dois ligantes, sendo os critérios de validação valores próximos a 2 Å (Coutsias et al., 2004; Coutias & Wester, 2019; Sargsyan et al., 2017).

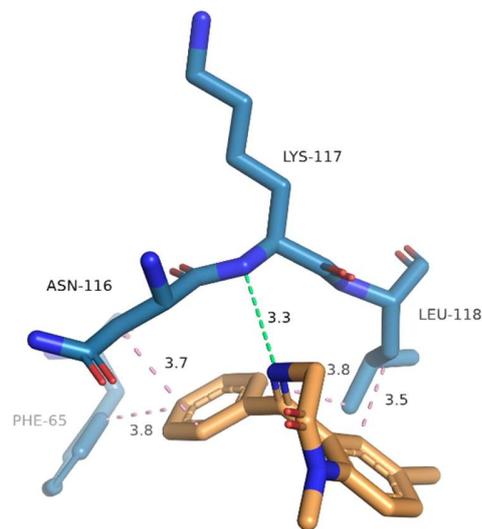
Todas as simulações realizadas (docking e re-docking) apresentaram valores de RMSD inferiores a 2 Å, destacando-se a melhor posição também dos principais complexos antheroxatin-proteína, violaxantin-proteína e lutein-proteína que apresentaram RMSD abaixo de 2,0 Å.

3.2. Interações do Docking molecular

Os parâmetros de docking molecular, incluindo os resultados e interações ligante-proteína e pontes de hidrogênio para compostos selecionados e drogas de referência, estão fornecidos na Tabela 1. As possíveis interações com o sítio ativo do receptor GABAA, neste experimento foram observadas com detalhes na figura 1.

A Figura 03 representa o ligante usado como referência, Diazepam® com a proteína receptora do GABAA, apresentando como principais interações do tipo alquila com os respectivos resíduos Phe 65 (3.8 Å), Asn 116 (3.7 Å), Leu 118 (3.5 e 3.8 Å) e por fim uma moderada ligação de hidrogênio com o resíduo Lys 117 (3.3 Å).

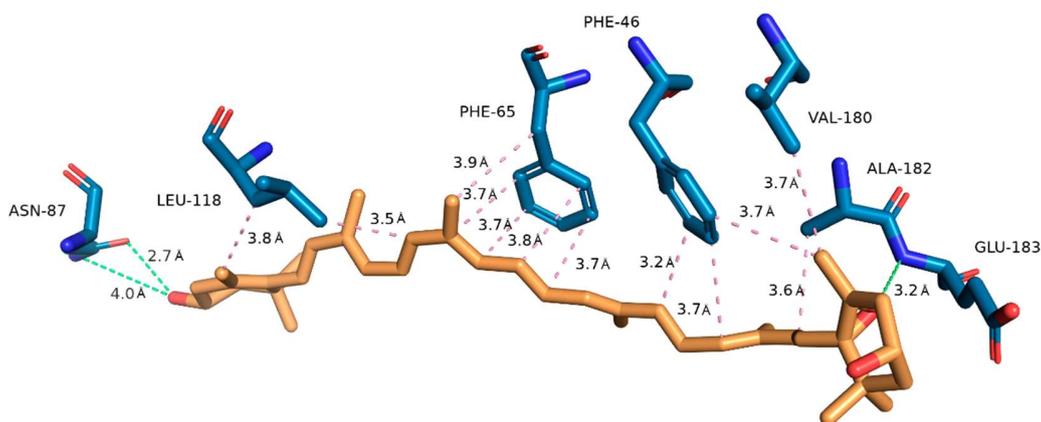
Figura 03. Representações 3D das interações entre os ligantes com os resíduos de aminoácidos e o complexo diazepam/proteína, visualizados no PyMOL.



Fonte: Autor (2024)

A Figura 04 representou o complexo entre o anteroxatina/proteína interagindo por meio de forças não covalentes do tipo alquila com os respectivos resíduos Leu 118 (3.8 e 3.5 Å), Phe 65 (3.9, 3.7, 3.7, 3.8, 3.7 Å) na região do aromático, Phe 46 (3.2, 3.7 e 3.7 Å), Val 180 (3.7 Å), Ala 182 (3.6 Å) e finalizando com 4 ligações de hidrogênio com os resíduos Asn 87 (2.7 e 4.0 Å) e Glu 183 (3.2 Å).

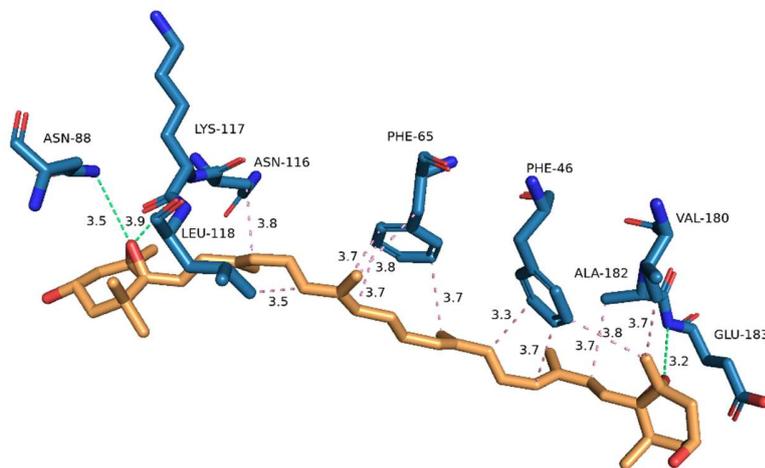
Figura 04. Representações 3D das interações entre os ligantes com os resíduos de aminoácidos e o complexo anteroxantina/proteína, visualizados no PyMOL.



Fonte: Autor (2024)

A Figura 05 representou o complexo entre o violaxantina/proteína interagindo por meio de forças não covalentes também do tipo alquila com os respectivos resíduos Asn 116 (3.8 Å), Leu 118 (3.5 Å), Phe 65 (3.7, 3.7 e 3.8 Å), Phe 46 (3.3, 3.7 e 3.7 Å), Ala 182 (3.8 Å e 3.7 Å) e concluindo com 3 ligações de hidrogênio com os resíduos Asn 88 (3.5 Å), Leu 118 (3.9 Å), Glu 183 (3.2 Å).

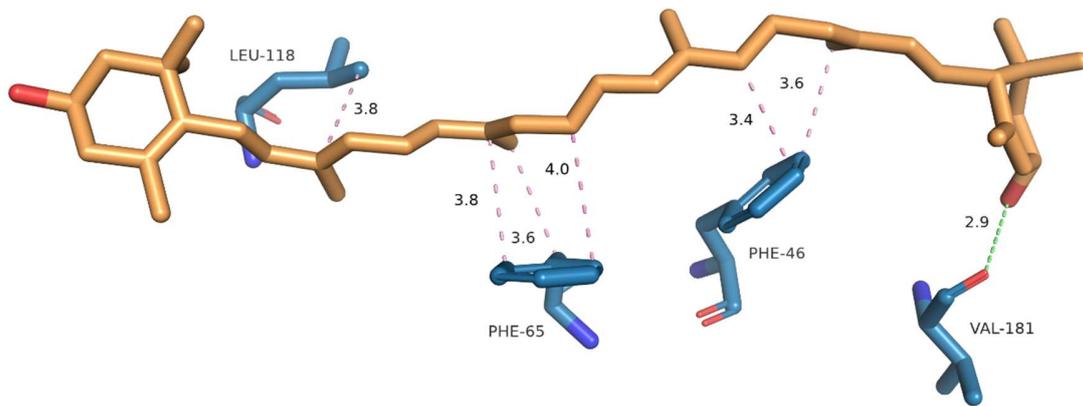
Figura 05. Representações 3D das interações entre os ligantes com os resíduos de aminoácidos e o complexo violaxantina/proteína, visualizados no PyMOL.



Fonte: Autor (2024)

Por fim, a Figura 06 representou o complexo entre o ligante lutein/proteína interagindo por meio de forças não covalentes também do tipo alquila com os respectivos resíduos Leu 118 (3.8 Å), Phe 65 (3.6, 3.8 e 4.0 Å), Phe 46 (3.4 e 3.6 Å), e para a finalização foi observada uma forte ligação de hidrogênio no resíduo Val 181 (2.9 Å). Vale salientar que em todos os complexos estudados no dokcin molecular evidenciou interações nos resíduos Phe 65 e Leu 118 que participam do sítio ativo da proteína e possivelmente essas estruturas podem ter o mesmo mecanismo de ação.

Figura 06. Representações 3D das interações entre os ligantes com os resíduos de aminoácidos e o complexo luteína/proteína, visualizados no PyMOL.



Fonte: Autor (2024)

4. CONCLUSÃO

O estudo de docking molecular, foi baseado na análise da composição fitoquímica do extrato da espécie *Calêndula officinalis L* a partir dos 23 compostos caracterizados e obtidos na literatura prévia. Os principais constituintes que apresentaram maior afinidade de energia no docking molecular foram a antheroxantina, a violaxantina e a luteína em comparação com o ligante de referência Diazepan®, obtido pelo repositório virtual. As simulações de docking molecular destacaram esses complexos formados por antheroxantina/receptor do GABAA, violaxantina/receptor do GABAA, lutein/receptor do GABAA e por fim o Diazepan®/receptor do GABAA, que apresentaram as melhores energias de afinidade no algoritmo AutoDock Vina com estimativa de -8,2 kcal/mol; -8,0 kcal/mol; -7.7 kcal/mol, e -6.3 kcal/mol, respectivamente. Além disso, a competição do composto antheroxantina com o diazepam®, frente a proteína responsável pela ação anti-inflamatória, receptor do GABAA foi considerado alta, inclusive na interação com os principais resíduos de ativação do sítio proteico, sugerindo que estes ligantes apresentaram potencial para o desenvolvimento de novos *hits* para aplicações terapêuticas nas situações de inflamação.

REFERÊNCIAS

Ameen F, AlYahya S, Govarathanan M, ALjahdali N, Al-Enazi N, Alsamhary K, Alshehri WA, Alwakeel SS, Alharbi SA (2020) Soil bacteria *Cupriavidus* sp. mediates the extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles. *J Mol Struct* 1202. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127233>.

Arshia AH, Shadravan S, Solhjo A, Sakhteman A, Sami A (2021) De novo design of novel protease inhibitor candidates in the treatment of SARS-CoV-2 using deep learning, docking, and molecular dynamic simulations. *Comput Biol Med* 139. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104967>.

Bai Q, Tan S, Xu T, Liu H, Huang J, Yao X (2021) MolAICal: a soft tool for 3D drug design of protein targets by artificial intelligence and classical algorithm. *Brief Bioinform* 22(3):1–12. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa161>.

Barrera N, Guerrero L, Debut A, Santa-Cruz P (2018) Printable nanocomposites of polymers and silver nanoparticles for antibacterial devices produced by DoD technology. *PLoS One* 13(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200918>.

Basak S, Gicheru Y, Kapoor A, Mayer ML, Filizola M, Chakrapani S (2019) Molecular mechanism of setron-mediated inhibition of full-length 5-HT_{3A} receptor. *Nat Commun* 10(1):1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11142-8>.

Batista de Andrade Neto J, Pessoa de Farias Cabral V, Brito Nogueira LF, Rocha da Silva C, Gurgel do Amaral Valente Sá L, Ramos da Silva A, Barbosa da Silva WM, Silva J, Marinho ES, Cavalcanti BC, Odorico de Moraes M, Nobre Júnior HV (2021) Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. *Microb Pathog* 155(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104892>.

Biovia DS (2016) *Discovery Studio Modeling Environment*, Release 2017, San Diego. Dassault Systèmes.

Bomfim MRP, Almeida EM, Matos-Rocha TJ, Santos AF (2020) Ethnobotanical study of medicinal plants used by the population assisted by the “programa de saúde da família” (Family health program)

in Marechal Deodoro-AI, Brazil. *Brazilian J Biol* 80(2):410–423. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.214039>.

Carvalho MCS, Souza TR, Freitas SP (2018) Efeito de compostos endógenos de *Calêndula officinalis* (calêndula) na Capacidade Antioxidante e Estabilidade Oxidativa do Óleo de Soja (*Glycine max*).

Csizmadia P (2019) MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web

DasGupta D, Mandalaparth V, Jayaram B (2017) A component analysis of the free energies of folding of 35 proteins: A consensus view on the thermodynamics of folding at the molecular level. *J Comput Chem* 38(32):2791–2801. <https://doi.org/10.1002/jcc.25072>.

de Sousa NF, Scotti L, de Moura ÉP, dos Santos Maia M, Rodrigues GCS, de Medeiros HIR, Lopes SM, Scotti MT (2021) Computer Aided Drug Design Methodologies with Natural Products in the Drug Research Against Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol* 20(5):857–885. <https://doi.org/10.2174/1570159x19666211005145952>.

DeLano WL (2020) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3. Schrödinger LLC

Diez M, Petuya V, Martínez-Cruz LA, Hernández A (2014) Insights into mechanism kinematics for protein motion simulation. *BMC Bioinformatics* 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-184>.

Divekar PA, Narayana S, Divekar BA, Kumar R, Gadratagi BG, Ray A, Singh AK, Rani V, Singh V, Singh AK, Kumar A, Singh RP, Meena RS, Behera TK (2022) Plant Secondary Metabolites as Defense Tools against Herbivores for Sustainable Crop Protection. *Int J Mol Sci* 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052690>.

Farago O (2019) Langevin thermostat for robust configurational and kinetic sampling. *Phys A Stat Mech its Appl* 534(122210). <https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.122210>.

Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG (2008) Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian J Microbiol*

39(1):61–63. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100015>.

Gohlke H, Case DA (2004) Converging Free Energy Estimates: MM-PB(GB)SA Studies on the Protein-Protein Complex Ras-Raf. *J Comput Chem* 25(2):238–250. <https://doi.org/10.1002/jcc.10379>.

Gohlke H, Kiel C, Case DA (2003) Insights into protein-protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS complexes. *J Mol Biol* 330(4):891–913. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00610-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00610-7).

Guido RVC, Andricopulo AD (2008) Modelagem Molecular de Fármacos. *Rev Process Químicos* 2(4):24–36. <https://doi.org/10.19142/rpq.v2i4.66>.

Halgren TA (1996) Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem* 17(5–6):490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).

Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, Vandermeersch T, Zurek E, Hutchison GR (2012) Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4(1):17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

Hassan SWM, Abd El-latif HH (2018) Characterization and applications of the biosynthesized silver nanoparticles by marine *Pseudomonas* sp. H64. *J Pure Appl Microbiol* 12(3):1289–1299. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.3.31>.

Huey R, Morris GM, Forli S (2012) Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. *Scripps Res Inst Mol* 32.

Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

Kato K, Nakayoshi T, Kurimoto E, Oda A (2021) Molecular dynamics simulations for the protein–ligand complex structures obtained by computational docking studies using implicit or explicit solvents. *Chem Phys Lett* 781(139022). <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2021.139022>.

Lima Melro JC, Fonseca SA, Silva Júnior JM, Franco SPB, Souza MA, Costa JG, Pimentel YFC,

Marinho EM, Batista de Andrade Neto J, Silva J, Rocha da Silva C, Cavalcanti BC, Marinho ES, Nobre Júnior HV (2020) Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. *Microb Pathog* 148:104365. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104365>.

Masiulis S, Desai R, Uchański T, Serna Martin I, Lavery D, Karia D, Malinauskas T, Zivanov J, Pardon E, Kotecha A, Steyaert J, Miller KW, Aricescu AR (2019) GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0832-5>.

Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M (2012) Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr Comput Aided-Drug Des* 7(2):146–157. <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.

Mishra AK, Mishra A, Pragya, Chattopadhyay P (2018) Screening of acute and sub-chronic dermal toxicity of *Calendula officinalis* L essential oil. *Regul Toxicol Pharmacol* 98:184–189. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.027>.

Morris GM, Huey R, W. Lindstrom, W. Lindstrom, M. Sanner, M. Sanner, R. Belew, R. Belew, D. Goodsell, D. Goodsell, A. Olson, A. Olson, J. Chem (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30(16):2785–2791.

Nadaf M, Amiri MS, Joharchi MR, Omidipour R, Moazezi M, Mohaddesi B, Taghavizadeh Yazdi ME, Mottaghipisheh J (2023) Ethnobotanical Diversity of Trees and Shrubs of Iran: A Comprehensive Review. *Int. J. Plant Biol.* 14.

Petrovska BB (2012) Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* 6

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004).

UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kalé L, Schulten K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26(16):1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.

Rădulescu V, Doneanu C, Loloiu T (2000) CGC investigation of chemical composition of *Calendula officinalis*. *Rev Roum Chim* 45(3):271–275.

Rigane G, Ben Younes S, Ghazghazi H, Ben Salem R (2013) Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. Growing in Tunisia. *Int Food Res J* 20(6):3001–3007.

Rose AS, Bradley AR, Valasatava Y, Duarte JM, Prlic A, Rose PW (2018) NGL viewer: Web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics* 34(21):3755–3758. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419>.

Shityakov S, Förster C (2014) In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Adv Appl Bioinforma Chem*. <https://doi.org/10.2147/AABC.S63749>.

Silva J, Rocha MN da, Marinho EM, Marinho MM, Marinho ES, Santos HS dos (2021) Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. *J Anal Pharm Res* 10(5):177–194. <https://doi.org/10.15406/japlr.2021.10.00384>.

Silva Mendes FR, Wlisses da Silva A, Amâncio Ferreira MK, de Lima Rebouças E, Marinho EM, Marinho MM, Bandeira PN, Rodrigues Teixeira AM, Silva Alencar de Menezes JE, Alves de Siqueira E, Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes R, Marinho ES, Silva dos Santos H (2022) GABAA receptor participation in anxiolytic and anticonvulsant effects of (E)-3-(furan-2-yl)-1-(2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one in adult zebrafish. *Neurochem Int* 155(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2022.105303>.

Singh K, Bhushan B, Singh B (2023) Advances in Drug Discovery and Design Using Computer-Aided Molecular Modeling. *Curr Comput Aided Drug Des* 20. <https://doi.org/10.2174/1573409920666230914123005>.

Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Comput Chem* 31(2):455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

Valarmathi N, Ameen F, Almansob A, Kumar P, Arunprakash S, Govarathanan M (2020) Utilization of marine seaweed *Spyridia filamentosa* for silver nanoparticles synthesis and its clinical applications. *Mater Lett* 263:127244. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127244>.

Vora LK, Gholap AD, Jetha K, Thakur RRS, Solanki HK, Chavda VP (2023) Artificial Intelligence in Pharmaceutical Technology and Drug Delivery Design. *Pharmaceutics* 15(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071916>.

Yan J, Zhang G, Pan J, Wang Y (2014) α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. *Int J Biol Macromol* 64:213–223. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.007>.

Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G (2016) The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules* 21(5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.

Yusuf D, Davis AM, Kleywegt GJ, Schmitt S (2008) An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *J Chem Inf Model*. <https://doi.org/10.1021/ci800084x>.