Estudo do Docking e da Dinâmica Molecular dos principais Inibidores da Glicoproteína Spike do Sars-Cov-2 através de inteligência artificial

Aluísio Marques da Fonseca,^{1, D*} Faustino Djata,^{2, D}

¹Academic Master in Sociobiodiversity and Sustainable Technologies, Institute of Engineering and Sustainable Development, University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, Auroras Campus, ZIP 62790970, Redenção, CE, Brazil; <u>aluisiomf@unilab.edu.br</u>;

²Institute of Exact Sciences and Nature, University of International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, ZIP 62790970, Redenção, CE, Brazil.; <u>djatafaustino@gmail.com</u>

Aluisio Marques da Fonseca* aluisiomf@unilab.edu.br

Abstract

At the end of 2019, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2) was the cause of unknown pneumonia, but soon after, it was portrayed as coronavirus 2019 (COVID-19). COVID-19 is an ongoing global pandemic that has claimed and threatened many lives worldwide. Before developing immune agents to combat SARS-CoV-2, potential screenings with numerous known drugs were previously carried out. Still, the efficacy to combat the critical problems was not satisfactory. Soon after, due to its potential for replication and infection, SARS-CoV-2 presented new variants, the result of an accumulation of mutations in the sequence and structure of the Spike (S) glycoprotein, which is by far the most critical protein for SARS-CoV-2. This protein participates directly in the replication of SARS-CoV-2 infection, pathogenicity, transmission, and evolution. In their mutation, they can carry the new variants that generally have the potential to be more transmissible and, therefore, can attenuate the immunity induced by the immunizers. The objective of this work was to theoretically find the main inhibitors of S glycoprotein of SARS-CoV-2, using the methodology of drug design De Novo, in the search for new antiviral agents, with the help of the MolAiCal computational package, which used machine learning and artificial intelligence.

Palavra-chave: Possible inhibitors of Sars cov-2, Spike-S, Molecular Docking.disease.

1. Introdução

O coronavírus humano só foi conhecido por causar novas infecções respiratórias com formas semelhantes às do resfriado comum até meados de 2002, sem qualquer preocupação por parte da saúde pública. No entanto, perto do final daquele ano, uma nova cepa de coronavírus surgiu, causando um surto de síndrome respiratório grave que estava ligado a pneumonia, insuficiência respiratória e fatalidade em Foshan City na província de Guangdong, na China. A doença inicialmente afetou pessoas que trabalhavam em mercados, restaurantes onde a vida selvagem carnívora é consumida, como as civetas, eram mantidos em recintos em condições inadequadas para consumo como alimento (GUAN et al., 2020). Mais tarde, descobriu-se que esses animais serviam como hospedeiros para o SARS-CoV, uma nova cepa do vírus, (LAU et al., 2015) (LAU et al., 2015). O surto de SARS-CoV foi associado a mutação que surgiram em um coronavírus de morcegos, o hospedeiro natural de maiorias dos coronavírus (LEI et al., 2018). O vírus SARS-CoV entra nas células através do receptor de angiotensina conversor de enzimas II (ECA2), como uma boa ilustração dos fatores virais que resultaram no surgimento de uma nova doença na população humana, as mutações que se acumularam no genoma do SARS-CoV causaram substituições de aminoácidos em superfície da proteína viral, que levou ao desenvolvimento da doença na melhoria da afinidade deste composto para o receptor ACE2 humano. Como resultado, os vírus evoluíram para um agente de infecção celular humana mais potente e tornou-se mais virulento e adequado para transmissão de uma pessoa para outra.

Entre 2002 e 2004, o SARS-CoV causou o primeiro surto generalizada de um coronavírus que foi relevante para a saúde pública. Desde então os pesquisadores têm tentado desvendar os mecanismos por trás de sua manutenção no mundo natural e ao mesmo tempo, suas adequações ao surgimento em novos ambientes hospitalares. As taxas incrivelmente altas de mutação foram observadas em coronavírus, apesar do fato de que esses vírus possuem sofisticados mecanismos para destacar e corrigir erros de replicação que nunca foram observadas na biologia de outros vírus e RNA (GORDON *et al.*, 2021). Esses mecanismos podem auxiliar na seleção e sobrevivência do vírus recombinantes em várias populações. Portanto, o objetivo deste trabalho foi encontrar principais inibidores de Glicoproteina Spike do SARS-CoV-2, estudar a interação entre o fármaco (ligante) e o receptor macromolecular biológico e entender o acoplamento e o nível da energia de reação do ligante e alvo biológico utilizando a metodologia in-silico para descobrir o provável candidato o combate SARS-CoV-2.

1.1. Fatores dos ambientes e do hospedeiro que influenciaram o surgimento de novos coronavírus humano

Semelhantemente como os outros SARS-CoVs o coronavírus SARS-CoV-2 causadores da pandemia COVID-19, surgiu como resultado de mutações que provavelmente foram causadas pelo SARS-CoV, de vítima de seleção natural de um estripe viral que foi transmitido por morcegos (ZHOU *et al.*, 2020). Embora o hospedeiro mediático do SARS-CoV-2 não tenha sido identificado, sabe-se que este vírus, como SARS-CoV, entra na célula através de receptor a Enzima Conversora da Angiotensina II (ACE2) humano, de forma diferente do SARS-CoV, o SARS-CoV-2 é capaz de usar furína, uma protease onipresente transmembrana expressa em todos os tipos de células, para ativar as glicoproteínas na superfície viral, facilitando a transmissão de vírus de uma célula para outra, sobrevivendo a atuação de anticorpos do hospedeiro, isso tem sido apontado como uma das causas para maior capacidade de propagação do vírus. De fato, o SARS-CoV-2 demonstrou ter maior condicionamento viral em cultura de tecido pulmonar humana, originando-se na liberação de grande quantidade de partículas virais infecciosas, geradas durante um período de 48 horas quando comparado ao SARS-CoV (CHU *et al.*, 2021). Essa aptidão do vírus em conceber progênito viral nos tecidos pulmonares poderia, talvez, ajudar a explicar a maior capacidade de transmissão da COVID-19 do que a SARS.

O SARS-CoV-2 pertences à família dos coronavírus e é uma grande família de vírus de RNA envelopados de sentido positivo e Cadeia única, constituído por quatro subgrupos: alfa, beta, delta e gama. Até o momento, sete coronavírus foram identificados capaz de infectar humanos e quatro deles que são: (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 e HCoV HKU1), foram associados aos leves esfriado, enquanto os outros três [Médio Oriente respiratório Síndrome do Coronavírus (MERS-CoV), SARS-CoV e SARS-CoV-2] podem causar infecção respiratória grave. MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1 são membros deste subgrupo Beta coronavírus (PRUIJSSERS; DENISON, 2019). O genoma do coronavírus codifica quatro Proteínas estruturais, nomeadamente Spike (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N). Nesses quatros proteínas estruturais escolheu-se proteína Spike (S) para o estudo e descoberta de novos possíveis inibidores.

1.2. Covid-19 e Coronavirus

No final de 2019, o SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*) apareceu e causou uma pneumonia desconhecida. Que agora é conhecida como doença de coronavírus 2019 (COVID-19). O COVID-19 é uma pandemia global em curso que ceifou e ameaçou muitas vidas em todo o mundo. Junto com as vacinas mais rápidas já desenvolvidas

para combater o SARS-CoV-2, porém as eficácias destas são mínimas com problemas críticos ao combate da doença.

Coronavírus é um pequeno vírus variando em dimensão de 65 a 125 nm e é um vírus de RNA de cadeia simples. As glicoproteínas Spike são o tipo de proteínas de fusão que realizam um papel essencial na ligação viral através de fenômenos de reconhecimentos e sua eventual entrada nas células hospedeiras (HADI *et al.*, 2020). A proteína Spike está presente na superfície externa do SARS-CoV-2 em uma forma homotrimérica e se liga ao receptor ACE2 humano, permitindo a entrada do virus nos pulmões. A fixação é mediada pela subunidade S1 da glicoproteína spike. Depois da captura a proteina spike modifica a confirmação da fusão e a internalização viral na célula hospedeira por meio de seu domínio de ligação, depois da captura. O mecanismo de fusão viral do SARS-CoV-2 depende principalmente da interação das regiões de repetição heptad 1 e 2 (HR1 e HR2) na proteína Spike.

1.3. Proteína S

A proteínas S homotriméricas altamente glicosilada pode ser dividida em duas subunidades S1 e S2 por proteólise dependente de Hospedeiro; a subunidade S1 contém um domínio de ligação ao DNA Receptor (RBD), medeia o reconhecimento do receptor host, enquanto a subunidade S2 ancora o pico no envelope Vírus, facilitam a fusão e a entrada das membranas celulares virais em células virais (HUANG *et al.*, 2020; XIA, 2021). Após a subunidade S1 e sua interação Receptores do hospedeiro, mudanças conformacionais desencadeiam mais Clivagem da subunidade S2 no local imediatamente S2' Quantidade de peptídeo de fusão cuja exposição resultou em fusão membrana e invasão viral. SARS-CoV S e SARS CoV-2 S-share enzima conversora de angiotensina humana 2 (hACE2) como receptor, enquanto MERS S usa um dipeptidil. A peptidase 4 (DPP4) atua como um receptor visando o SARS-CoV-2 S.

1.4. A criação de Food and Drug adminitration

Paul Erlich, prêmio Nobel em 1908, foi um dos pesquisadores que mais destacou na sua época para o desenvolvimento da indústria farmacêutica, o Emil Fischer, 1899-1908, já tinha estabelecido o conceito sobre o mecanismo de ação das drogas (Corpora Non Agunt Nisi- Uma substância química não é eficaz a menos que seja capaz de se ligar a um sítio específico). E foi o Paul Erlich o responsável na aplicação das regras que regem a eficácia de um fármaco ao acompanhar os efeitos colaterais causadas pela Salvrsan, o medicamento desenvolvido por ele a partir de transformações estruturais em compostos denominados arsenobenzenos, no

tratamento de Sífilis em clinicas do seu País Alemanha (VALENT *et al.*, 2016). Com inícios da primeira e segunda guerra mundial e os avanços tecnológicos, a indústria farmacêutica se desenvolveu em grande parte do mundo, e os novos medicamentos foram sintetizadas. Porém não existia a fiscalização na utilização dessas drogas, o que causou desastres e acidentes históricos, como a morte de centenas de crianças nos UEA por envenenamento após a aplicação de um elixir de sulfonamida que tinha 72% de dietilenoglicol ($C_2H_6O_2$) como veículo. Este acontecimento resultou na formulação dos princípios básicos dos testes clínicos para novos fármacos por Ceiling e Cannon (1938). A partir desse ano, foram definidos os conceitos para a utilização de voluntários em estudos clínicos, e criando os comitês de ética em pesquisa clínica. Com estas iniciativas resultou-se a criação de Food and Drug adminitration em 1906 (FDA), que cuidava de análise dos medicamentos no que tange com o grau de pureza e padrão de qualidade. Inicialmente a imperícia no uso da talidomida, induziu a FDA a definir em 1962, as regras de que o fabricante de um novo medicamento deve provar não só o efeito positivo, mas também as suas seguraças, antes da sua aplicação clinica ou de sua propaganda (THIND; KOWEY, 2020).

Estes desastres farmacêuticos causaram revolução nos estudos para desenvolvimentos de novos fármacos atualmente. No entanto para introduzir uma molécula, ou um fármaco novo em potencial, no mercado como um medicamento, leva mais de dez a quinze anos de pesquisas, agrupando diversos profissionais de diferentes áreas do conhecimento, como químicos, médicos, biólogos, farmacêuticos, e investimentos que variam entre USS 500 milhões e USS 1 bilhão (MOHS; GREIG, 2017). Tais pesquisas são realizadas para a segurança de população perante as novas descobertas de novos medicamentos a fim de prevenir os catastróficos decorrentes nos anos anteriores.

Com a nova tecnologia digital pode-se reduzir esses anos aplicando metodologia computacionais que mostram as possíveis interações entre o fármaco e o material biológico com os estudos de docking molecular utilizando os softwares que indicam a provável eficácia da interação entre as moléculas micro(ligante) e macromolécula(o enzima ou proteína) não sendo necessário a tanta demora para lançar um medicamento.

1.5. Docking molecular

O docking molecular é um método computacional amplamente aplicada na área de química computacional e biologia estrutural. Ela exerce um papel importante no avanço de desenvolvimento de medicamentos, auxiliando a entender as interações de ligação mais prováveis entre um ligante e um receptor macromolecular biológico, permitindo calcular a energia de interação a partir de funções de pontuação ou de scoring. Esta avaliação tem como finalidade de traçar uma correlação entre ligante e alvo molecular e uma elevada atividade biológica. Para atingir a tal objetivo é necessária uma descrição do sistema biológico. Essa feramente é importante, pois auxilia na busca de novos fármacos, além disso permite também analise de várias moléculas capazes de se ligarem a determinados sítios receptores proporcionando a diminuição de tempo e elevados custos que estão relacionados a dinâmica e desenvolvimento de novos medicamentos (MENG *et al.*, 2011). Os métodos da investigação da afinidade entre ligante e receptor ou a atividade biologia são formadas por dois componentes fundamenteis: o algoritmo de busca e de função de avalição, responsáveis respetivamente por investigar diferentes conformações e orientações dos ligantes dentro da proteína alvo; e responsável por calcular a afinidade de ligação das conformações geradas, classificando-as e caracterizando a forma de ligação mais favorável do ligante ao alvo molecular, onde é identificado a formação do complexo com menor energia.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparação estrutural proteica

A estrutura cristalina do SARS-CoV-2 Spike S (PDB ID, 7B62) foi fornecida pelo PDB Data Bank (https://www.rcsb.org/). O ligante Co cristalizado foi excluído do cristal do SARS-CoV-2 Spike S, para o design de drogas *De novo* e a *deep learning* (DL), respectivamente. O arquivo de grade de SARS-CoV-2 Spike foi produzido para o crescimento de fragmentos pelo pacote do MolAICal (https://molaical.github.io). Os fragmentos iniciais de crescimento do SARS-CoV-2 Spike foi um esqueleto base da estrutura do ligante nativo. A estrutura de SARS-CoV-2 spike foi preparada para a triagem virtual usando MGLTools (Morris et al., 2009). As cargas gasteiger e hidrogênios polares foram adicionadas no SARS-CoV-2 Spike, que foram salvos no formato molecular PDBQT. A cavidade para o design de drogas foi definida pelo ligante Co cristalizado do SARS-CoV-2 Spike.

2.2. Modelo deep learning e design de drogas de novo

O MolAICal conteve o modelo gerador de *deep learning* da droga, que foi treinado a partir de 21.064 fragmentos de medicamentos aprovados pela FDA. Os 90 fragmentos gerados pelo MolAICal e outros 30 básicos fragmentos foram misturados para crescimento de fragmentos na cavidade do SARS-CoV-2 Spike.

2.2.1. Coordenadas do grid

As coordenadas x, y e z do centro da caixa de cavidade do SARS-CoV-2 Spike foram definidas para -10.733, 12.416 e 68.829 Å, respectivamente. Os comprimentos da caixa de cavidade do SARS-CoV-2 Spike foi definida para 30.0 Å ao longo da direção x, y e z. As moléculas elitistas serão extraídas para o próximo crescimento evoluído de 10% das populações moleculares geradas. As 140 melhores moléculas de populações moleculares geradas foram geradas como as moléculas-mãe. Para aumentar a diversidade e novidade de ligantes de crescimento, mais 60 moléculas foram selecionadas aleatoriamente a partir das populações moleculares geradas. A população máxima estará fixada em 3000.

2.2.2. Pontos de Fibonacci

Os 361 pontos de Fibonacci foram gerados para a busca de perturbação de fragmentos. Os operadores de crossover e mutação foram definidos para 1.0 e 0.5, respectivamente.

2.2.3. Filtro de Lipinski

De acordo com a regra de cinco de Lipinski valores de ligantes de cristal no SARS-CoV-2 Spike foram definidos para os valores de XLOGP (6.0), aceitadores de hidrogênio (12), doadores de hidrogênio (6), peso molecular (1000) e ligações rotativas (14).

2.2.4. Interferências

Os compostos de interferência pan-assay (PAINS) filtraram os ligantes de crescimento indesejados.

2.2.5. Acessibilidade de síntese

A pontuação de acessibilidade sintética dos ligantes de crescimento foram salvos no arquivo de resultados estatísticos, no final da simulação. Um total de 30 gerações de ciclo foram realizadas para todo o processo de design de drogas. Um total de seis processos paralelos de design de medicamentos foram realizados no SARSCoV-2 Spike. Os ligantes gerados do SARS-CoV-2spike foram salvos entre 480 e 785 do peso molecular.

2.2.6. Processamento

Foram executados um total de 30 multicores de CPU paralelamente para todo processo de crescimento molecular. Todo o processo de projeto de drogas combinado com modelo de *deep learning* e programação clássica foram realizado automaticamente pelo pacote projetado do MolAICal.

2.2.7. Dinâmica molecular

Para realizar o estudo de DM foi necessário obter as posições atômicas do complexo receptor-ligante após a realização do docking molecular pelo AutoDock Vina e os arquivos de topologia (extensão PSF). Ambos os arquivos foram obtidos usando servidor CHARMM (https://www.charmm-gui.org/). O complexo receptor-ligante foi inserido em uma caixa cúbica de 10 Å de aresta. O complexo foi simulado em meio aquoso. As moléculas de água foram descritas pelo campo de força TIP3P. Íons também foram adicionados para garantir a neutralidade do sistema. Condições periódicas de contorno foram utilizadas e a restrição de vibração em ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio, ângulo HOH e distância de ligação OH foi descrita pelo algoritmo SHAKE. Os passos de integração de cada etapa foram iguais a 2 ft (FIELD et al, 2000).

No processo houve corte de interação eletrostática de 9.0 Å em todas as etapas da simulação. As geometrias foram otimizadas por estágios sequenciais de minimização. Em seguida, as geometrias foram submetidas a dois estágios de equilíbrio por 10 ns cada, o primeiro com temperatura constante (NVT) de 310K e o segundo com pressão (NPT) constante a 1,0 atm para a produção (entre 100-200ns, dependendo de sua estabilização). As simulações foram realizadas por meio do programa NAMD versão 2.0, e a análise e visualização dos resultados pelo programa VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), os gráficos foram gerados utilizando o programa Qtrace (PHILLIPS et al, 2005; LIMA et al, 2012).

3. Resultados e discussão

3.1. Processamento

A geração molecular contra a proteína alvo foi realizada usando o pacote computacional MolAiCal (Bai et al. 2021) em uma CPU Intel de 10^a geração i7, Intel®™ Core, de 32 GB de RAM e uma GPU NVIDIA® GeForce® GTX 1660 Ti, com tempo de varredura definido para 36h. Dez clusters foram utilizados para gerar as estruturas. Uma média de aproximadamente 5.100 moléculas foram desenvolvidas para a proteína-alvo durante o período experimental.

3.2. Produção de hits

Após o novo método de planejamento de fármacos, utilizando software de inteligência artificial MolAICal, obtive-se 304 Hits (a substância ativa do sistema), a partir da estrutura inicial de crescimento do pirrol dimérico (PD), derivada da BLA(ligante nativo encontrado na proteína estudado), na Figura 1



Figure 1. Initial growth structure pyrrol dimeric (PD). (esturtura de crecimento inicial pirrol dimérco)

Segue-se as pontuações das energias de ligações obtidos na interação

Até 10 clusters foram processados, com exceção da maioria das estruturas no cluster 1, onde a grande parte variou de -3.71 a -5.87 kcal/mol, todas as demais obtiveram as estruturas com as melhores energias < -6 kcal/mol, com variação da energia de afinidade em torno de - 11,12 a -6,00 kcal/mol. Como mostra a Figura 2.



Figure 2. (a) Números de hits de cada clusters verso a afinidade da energia no AutoDock Vina.

3.3. Disponibilidade sintética

Uma das vantagens do uso de uma nova abordagem de planejamento de fármacos é que alguns fragmentos bem posicionados e ligações de hidrogênio podem fornecer interação energética significativa. No entanto, à medida que a diversidade de fragmentos plausíveis aumenta, a oportunidade de criar composições terapêuticas se tornará mais difícil (Jain & Agrawal, 2004; Wang et al., 2022). Outra questão está relacionada à limitação deste método, que pode sugerir diretamente testes dos ligantes formados. Uma abordagem para estimar a facilidade de síntese de um ligante é chamada de acessibilidade sintética (AS), usada para gerar moléculas semelhantes a fármacos e necessária em muitas áreas no processo de descoberta de fármacos. A avaliação do A.S de um lead candidato (hit) é uma tarefa que desempenha um papel na descoberta do lead, independentemente do método pelo qual o lead candidate é identificado. Quanto mais complexa for a síntese do candidato principal, mais tempo e recursos serão necessários para explorar essa área específica do espaço químico. No caso de uma molécula projetada em De novo, a validação experimental de sua atividade requer a síntese do composto. No caso de exploração prática ou virtual da SAR em torno do hit, o acesso sintético ao quimiotipo também pode ser necessário (Scotti et al. 2013).

Quando estruturas químicas são construídas durante o processo do novo projeto, não se pode dar como certo que a síntese química de tais compostos seja viável. Portanto, é ainda mais importante estimar se esses compostos podem ser sintetizados com esforço razoável. O padrão de acessibilidade sintética (AS) dos acertos do estudo apresentaram um comportamento bastante característico da literatura, onde quando a proteína melhor se ajusta, mais complexa se torna a síntese (Ertl e Schuffenhauer 2009). No entanto, é possível obter acertos com facilidade de 58,96%, com uma afinidade energética de até -11,12 kcal/mol, como mostra a Figura 3.



Figura 3. Acessibilidade sintética versus energia de afinidade sugerida pelo AutoDock Vina.

3.4. Energia de afinidade

Em seguida, a partir dos análogos produzidos, foram selecionados os melhores resultados em termos de geometria e eletrostática, desencadeando a opção de agrupar os ligantes em agrupamentos de similaridade. Selecionou-se um representante de cada conjunto e ordenamos esses representantes de acordo com a energia de afinidade/disponibilidade sintética.

Os resultados dos experimentos de geração mostraram que as moléculas obtidas em tempos posteriores tiveram um melhor escore de ajuste. Os resultados da glicoproteina demonstram bem essa tendência, uma vez que os aglomerados gerados foram formados proporcionalmente ao tempo. Assim, isso é possível porque valores mais altos geram moléculas mais diversas, mas a convergência dos escores de encaixe torna-se menor. De acordo com a metodologia, o cluster 1 apresentou estruturas que não interagiram bem com a Spike, conferindo energias de até -6,34 kcal/mol, onde foram gerados 31 acertos. No Cluster 2, houve um aumento de afinidade nos resultados apresentando energias de até -7,63 kcal/mol, onde foram gerados aproximadamente 32 acertos, considerando que as estruturas apresentaram maior complexidade estrutural. Os desenhos do cluster 10 foram os que melhor apresentaram afinidade com a Glicoproteina Spike, com energias de afinidade de até -11,12 kcal/mol, gerando o maior número de acertos, cerca de 62 estruturas, sendo os Hits 298 e Hit 304 (figura 3) as estrutura com as melhores energias de afinidade de todas na simulação de acoplamento molecular. Apesar de que o cluster 1, em particular, apresentou o modelo que melhor se adequava aos 80% de acessibilidade sintética. Ainda assim, suas energias não foram destacadas na afinidade, superior a -3,71 kcal/mol, o que não gerou interesse em no filtro. Os demais clusters apresentaram energias muito semelhantes na faixa de -9,0 a -10,0 kcal/mol, muito mais favoráveis que o ligante de referência (BLA). Esses resultados são apresentados na Tabela 2.



Figura 4. As restructures de hit de 298 e Hit 304 foram gerados pela inteligência Artificial (AI) Tabela 1. Dados dos clusters gerados de 1 a 10 e faixas de suas energias e números de estruturas.

Número de Clusters	Faixa de potência de afinidade	Número de hits gerados
cluster 1	-3.71 a -6.34 kcal/mol	31
cluster 2	-6.36 a -7.63 kcal/mol	32
cluster 3	-9.31 a -9.62 kcal/mol	25
cluster 4	-8.64 a -8.96 kcal/mol	39
cluster 5	-9.23 a -9.30 kcal/mol	06
cluster 6	-8.95 a -9.10 kcal/mol	21
cluster 7	-7.67 a -8.27 kcal/mol	32
cluster 8	-8.28 a -8.63 kcal/mol	32
cluster 9	-9.08 a -9.29 kcal/mol	23
cluster 10	-9.63 a -11.12 kcal/mol	63

3.5. Interações do docking molecular

Os parâmetros de docking molecular, incluindo os resultados e interações liganteproteína e pontes de hidrogênio para compostos selecionados e drogas de referência, estão fornecidos na Tabela 1. As possíveis interações com o sítio ativo da proteína, neste experimento são discutidas aqui com alguns detalhes nas imagens 1 e 2. Medicamentos de referência, os fragmentos de BLA, HIT 298 e Hit 304 que anteriormente foram escolhidos 209, e que foram selecionados 9 ligantes e por último indicou-se duas estruturas as com menor energia, que foram considerados como as melhores em termos da interação com o sítio ativo da glicoproteína Spike (S), com uma pontuação de ancoragem de energia variando entre -10.02 kcal/mol a -11,12 kcal/mol, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 1 abaixo.

A figura 1 representa o ligante nativo conhecido como BLA a imagem foi adquirida no *descovery studio* ao limpar a proteína e deixar o ligante livre. A Figura 2 representa a molécula alvo a glicoproteína Spike S do SARS-CoV-2 e nela está contida o

BLA que é o ligante nativo, e esse ligante foi retirado para facilitar acoplamento do novo ligante no espaço.

Docagem molecular

A estimativa da energia livre de ligação entre potenciais inibidores e receptor foi realizada através de um experimento de docking utilizando o prompt comando para obter esses resultados. A Tabela 2. mostra os resultados da análise de docking entre os fragmentos de BLA selecionados com a Glicoproteína Spike (S) (7B62). Os resultados do docking mostraram que fragmentos apresentam posições de ligação favoráveis com a glicoproteína Spike do SARS-CoV-2.

Ligante	Cluster	Energy	AS
HIT298	10	-10.02	74.12
HIT304	10	-11.12	58.96
BLA	-	-8.2	-

Tabela 2.

A tabela da docagem molecular com as interações nas imagem abaixo



Figura 5. Ligante nativo (BLA).



Figura 6. Proteína com o Hit 298



Figura 7. Proteína com o Hit 304

3.6. Dinâmica molecular

proteína-ligante-solvente-íon pode representar Um complexo um sistema termodinâmico composto de soluto e solvente. Nesse sistema, ocorrem interações de vários tipos (forças intermoleculares), além de trocas térmicas entre as moléculas e os íons presentes;

Assim, como ditam as leis da termodinâmica, a relação entre essas moléculas e como acontece a transferência de calor está relacionada a diversas mudanças energéticas (Arcon et al. 2017; Beretta 2020; Struchtrup 2020; Chinaka 2021). A partir disso, simulações de dinâmica molecular foram realizadas com complexos proteína-ligante através de NAMD para avaliar possíveis mudanças conformacionais globais e estabilidade proteica após cada conformação e obter informações sobre o mecanismo de interação dos complexos em nível molecular (Du et al. 2016; Byléhn et al., 2021).

3.6.1. Análise RMSD

Logo após o acoplamento molecular, foi realizado estudo de dinâmica molecular com Hit 208 e Hit 304, de acordo com o sítio catalítico da glicoproteína Spike (Figura 6). Observouse que os valores médios da distância nas moléculas em docagem,(RMSD) para todas as simulações de 100 ns nas etapas de produção foram em torno de 1,0-1,5 Å para Hit 298/Glicoproteina S e 1,5-2,2 Å para Hit 304/ Glicoproteina S, em comparação com o ligante de referência BLA com a proteína, que teve uma média de 2,2 Å em toda sua trajetória. Para Hit 298/complexo MD, o equilíbrio foi obtido a partir de 57 ns, com RMSD médio de 1,3 Å. Enquanto, na DM do complexo Hit 304, foi mais estável já dos primeiros 70 ns até sua conclusão, em 100ns, ao longo de sua trajetória, não ultrapassando os valores médios de RMSD de 2,2 Å; por fim, com o complexo proteína/BLA, apresentou um valor total de 2,2 Å em toda a trajetória. Isso é justificado em estudos anteriores, que realizaram simulações de DM para verificar a estabilidade da enzima protease viral em uma solução aquosa com diferentes ligantes contendo diferentes níveis de hélice α e β . Portanto, essas interações de longo alcance foram calculadas usando o procedimento SPME e um banho termal Langevin a 310 K (Miyamoto et al. 2014).



Figure 8. Root Mean Square Deviation (RMSD), referente à confirmação inicial do complexo liganteenzima versus o tempo de simulação (ns) na etapa de simulação de produção do MD com Hit 298/proteina (vermelho), Hit 304/proteína (preto) e MD com BLA/proteína (verde).

3.7.2. Análise de Flutuação de átomos ao longo do tempo ou Root Mean Squere Flutuation (RMSF)

O RMSF do sistema foi realizado para entender o deslocamento e a estabilidade de cada resíduo proteico na trajetória da simulação de 100ns. A Figura 7 se sobrepõe às principais interações dos principais complexos estudados (Hit 298, Hit 304 e BLA com a Glicoproteina). Assim, pode-se concluir que houve alterações conformacionais significativas dos complexos Hit 298/Proteina e BLA/proteina durante os tempos de simulação. Os resultados sugerem que as trajetórias das simulações de dinâmica molecular após as etapas de produção apresentaram oscilações médias com correlações significativas com resíduos críticos na replicação (Roe e Brooks 2020; Qin et al., 2021). Inicialmente, ao analisar o complexo formado entre Hit 298 e proteina, valores maiores que 2,4 Å para resíduos próximos ao Phe 55. Os complexos formados entre a BLA e a proteína apresentaram três com valores superiores a 2,0 Å nos resíduos Phe 55, Gln 134 e Leu 223. Por fim, para o Hit 304, não forma apresentadas flutuações acima de 2,0 Å. As conformações obtidas nas simulações MD foram complexadas com vários ligantes através de técnicas de acoplamento, gerando informações importantes sobre os modos de ligação de pequenas moléculas nos diferentes estados de enovelamento enzimático.



Figure 9. Root Mean Square Fluctuation (RMSF), concerning the initial confirmation of the ligandenzyme complex versus the simulation time (ns) in the production simulations step of the MD com Hit 298/proteina (vermelho), Hit 304/proteína (preto) e MD com BLA/proteína (verde).

3.6.3. Análise de ligações H

Como o objetivo de se gerar novos fármacos, o número de ligações de hidrogênio é essencial para verificar se um complexo atingiu a estabilidade em um sistema dinâmico (Ragunathan et al. 2018; Mascoli et al., 2021).

Após os 100ns, foi possível verificar as ligações de hidrogênio formadas entre glicoproteína com seus respectivos ligantes simulados em longos estágios de produção em dinâmica molecular, na Figura 8. Durante a simulação, houve mudanças nas redes de ligação de hidrogênio, e o número de interações flutuou entre 3 ou 4 para a proteína, o complexo formado entre Hit 298 e proteína foi mais estável pelo número de vezes que houve três interações de hidrogênio ao longo da trajetória da dinâmica molecular. No complexo da proteína com Hit 304, as ligações de hidrogênio isoladas e o número médio moderado de ligações de hidrogênio por período (até 4) sugeriram que as redes de ligações de hidrogênio foram relativamente adequadas e medianas, formando conexões razoáveis durante sua trajetória, porém não mais que o ligante anterior. Por fim, o complexo formado com BLA, também se repetiu com o complexo e Hit 304, porém foi mais efetivo com ligações forte ou medianas.

O momento em que essas conexões estavam muito presentes sugeriu que essa interação manteve a estabilidade do complexo além do tamanho dos compostos e suas funcionalidades (Qin et al. 2021).

Portanto, correlações complementares podem ser observadas na comparação de ligações de hidrogênio formadas em dinâmica molecular com aquelas previamente obtidas pelo processo de acoplamento, indicando a convergência de um método estático para um processo de sistema contínuo.





Conclusão

No estudo *in silico* foram geradas 304 estruturas por inteligência artificial, a partir de uma subestrutura do BLA, que é o ligante nativo de referência para glicoproteína Spike. O pacote computacional utilizado foi o MolAiCal, que se mostrou competente em suas estruturas geradas. Baseado nos filtros pré-definidos foram analisadas das 304 estruturas os Hit 298 e o Hit 304, onde se observaram que os efeitos de inibição da proteína foram antagonizados pelo BLA, sugerindo forte evidência de um mecanismo semelhante entre o ligante de referência e as estruturas estudadas. Os resultados de acoplamento molecular mostraram que tanto o Hit 298, como Hit 304 têm maior afinidade pelo receptor do que BLA e ligação na mesma região do sítio de ligação do BLA, indicando um efeito semelhante ao da droga. Esse efeito foi mais bem evidenciado pelo estudo adicional de dinâmica molecular que apresentou estabilidade quando o complexo foi formado e, assim, fornece subsídios para o desenvolvimento de novos fármacos que atuam na inibição do Sars-Cov-2.

REFERÊNCIAS

Arcon JP, Defelipe LA, Modenutti CP, López ED, Alvarez-Garcia D, Barril X, Turjanski AG, Martí MA (2017) Molecular Dynamics in Mixed Solvents Reveals Protein-Ligand Interactions, Improves Docking, and Allows Accurate Binding Free Energy Predictions. J Chem Inf Model 57(4):846–863. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.6b00678

Arshia AH, Shadravan S, Solhjoo 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.compbiomed.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

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

Beesley NJ, Cwiklinski K, Allen K, Hoyle RC, Spithill TW, James La Course E, Williams DJL, Paterson S, Hodgkinson JE (2023) A major locus confers triclabendazole resistance in Fasciola hepatica and shows dominant inheritance. PLoS Pathog 19(1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011081

Ben-Tal N, Honig B, Bagdassarian CK, Ben-Shaul A (2000) Association entropy in adsorption processes. Biophys J 79(3):1180–1187. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76372-7

Beretta GP (2020) The fourth law of thermodynamics: Steepest entropy ascent. Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci 378(2170):1–17. https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0168

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

Byléhn F, Menéndez CA, Perez-Lemus GR, Alvarado W, De Pablo JJ (2021) Modeling the Binding Mechanism of Remdesivir, Favilavir, and Ribavirin to SARS-CoV-2 RNA-Dependent RNA Polymerase. ACS Cent Sci 7(1):164–174. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01242

Cai X, Wang X, Huang ZT, Wang FH (2016) Single channel steepest descent algorithm for the correction of cycle frequency error. IET Commun 10(14):1829–1838. https://doi.org/10.1049/iet-com.2015.1235

Chaaban S, Jariwala S, Hsu CT, Redemann S, Kollman JM, Müller-Reichert T, Sept D, Bui KH, Brouhard GJ (2018) The Structure and Dynamics of C. elegans Tubulin Reveals the Mechanistic Basis of Microtubule Growth. Dev Cell 47(2):191-204.e8. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.08.023

Chinaka TW (2021) Introducing the second law of thermodynamics using Legitimation Code Theory among first year chemistry students. Cypriot J. Educ. Sci. 16:981–994

Chu, H.; Chan, J. F.-W.; Wang, Y.; Yuen, T. T.-T.; Chai, Y.; Shuai, H.; Yang, D.; Hu, B.; Huang, X.; Zhang, X.; Hou, Y.; Cai, J.-P.; Zhang, A. J.; Zhou, J.; Yuan, S.; To, K. K.-W.; Hung, I. F.-N.; Cheung, T. T.; Ng, A. T.-L.; Hau-Yee Chan, I.; Wong, I. Y.-H.; Law, S. Y.-K.; Foo, D. C.-C.; Leung, W.-K.; Yuen, K.-Y. SARS-CoV-2 Induces a More Robust Innate Immune Response and Replicates Less Efficiently Than SARS-CoV in the Human Intestines: An Ex Vivo Study With Implications on Pathogenesis of COVID-19. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 771–781, 2021.

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

DasGupta D, Mandalaparthy 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

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

Du X, Li Y, Xia YL, Ai SM, Liang J, Sang P, Ji XL, Liu SQ (2016) Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. Int J Mol Sci 17(2):1–34. https://doi.org/10.3390/ijms17020144

Emirik M (2022) Potential therapeutic effect of turmeric contents against SARS-CoV-2 compared with experimental COVID-19 therapies: in silico study. J Biomol Struct Dyn 40(5):2024–2037. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1835719

Ertl P, Schuffenhauer A (2009) Estimation of synthetic accessibility score of drug-like molecules based on molecular complexity and fragment contributions. J Cheminform 1(1). https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-8

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

Fortes FS, Molento MB (2013) Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: Avanços e limitações para seu diagnóstico. Pesqui Vet Bras 33(12):1391–1402. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200001

Genheden S, Ryde U (2015) The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. Expert Opin Drug Discov 10(5):449–461. https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936

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

Gordon, C. J.; Tchesnokov, E. P.; Schinazi, R. F.; Götte, M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. Journal of Biological Chemistry, [s. l.], v. 297, n. 1, p. 100770, 2021.

Guan, W.; Ni, Z.; Hu, Yu; Liang, W.; Ou, C.; He, J.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.; Hui, D. S. C.; Du, B.; Li, L.; Zeng, G.; Yuen, K.-Y.; Chen, R.; Tang, C.; Wang, T.; Chen, P.; Xiang, J.; Li, S.; Wang, Jin-Lin; Liang, Z.; Peng, Y.; Wei, L.; Liu, Y.; Hu, Ya-Hua; Peng, P.; Wang, Jian-Ming; Liu, J.; Chen, Z.; Li, G.; Zheng, Z.; Qiu, S.; Luo, J.; Ye, C.; Zhu, S.; Zhong, N. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. New England Journal of Medicine, [s. 1.], v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020.

Hadi, J.; Dunowska, M.; Wu, S.; Brightwell, G. Control Measures for SARS-CoV-2: A Review on Light-Based Inactivation of Single-Stranded RNA Viruses. Pathogens, [s. 1.], v. 9, n. 9, p. 737, 2020.

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

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

Harrach MF, Drossel B (2014) Structure and dynamics of TIP3P, TIP4P, and TIP5P water near smooth and atomistic walls of different hydroaffinity. J Chem Phys 140(17):1–15. https://doi.org/10.1063/1.4872239

Holden-Dye L, Walker RJ (2007) Anthelmintic drugs.

Huang, Y.; Yang, C.; Xu, X.; Xu, W.; Liu, S. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. Acta Pharmacologica Sinica, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020.

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

Jain SK, Agrawal A (2004) De novo drug design: An overview. Indian J. Pharm. Sci. 66:721-728

Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG (2011) Antiparasitic therapy. Mayo Clin Proc 86(6):561–583. https://doi.org/10.4065/mcp.2011.0203

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

Lau, S. K. P.; Feng, Y.; Chen, H.; Luk, H. K. H.; Yang, W.-H.; Li, K. S. M.; Zhang, Y.-Z.; Huang, Y.; Song, Z.-Z.; Chow, W.-N.; Fan, R. Y. Y.; Ahmed, S. S.; Yeung, H. C.; Lam, C. S. F.; Cai, J.-P.; Wong, S. S. Y.; Chan, J. F. W.; Yuen, K.-Y.; Zhang, H.-L.; Woo, P. C. Y. Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus ORF8 Protein Is Acquired from SARS-Related Coronavirus from Greater Horseshoe Bats through Recombination. Journal of Virology, [s. 1.], v. 89, n. 20, p. 10532–10547, 2015.

Lei, H.; Li, Y.; Xiao, S.; Lin, C.-H.; Norris, S. L.; Wei, D.; Hu, Z.; Ji, S. Routes of transmission of influenza A H1N1, SARS CoV, and norovirus in air cabin: Comparative analyses. Indoor Air, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 394–403, 2018.

Lima AH, Souza PRM, Alencar N, Lameira J, Govender T, Kruger HG, Maguire GEM, Alves CN (2012) Molecular Modeling of T. rangeli, T. brucei gambiense, and T. evansi Sialidases in Complex with the DANA Inhibitor. Chem Biol Drug Des 80(1):114–120. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01380.x

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

Mascoli V, Liguori N, Cupellini L, Elias E, Mennucci B, Croce R (2021) Uncovering the interactions driving carotenoid binding in light-harvesting complexes. Chem Sci 12(14):5113–5122. https://doi.org/10.1039/d1sc00071c

Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. Current computer-aided drug design, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

Miyamoto Y, Motohashi H, Suyama T, Yokoyama J (2014) Langevin description of gauged scalar fields in a thermal bath. Phys Rev D - Part Fields, Gravit Cosmol 89(8). https://doi.org/10.1103/PhysRevD.89.085037

Mohs, R. C.; Greig, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 651–657, 2017.

Morris GM, Huey R Fau - Lindstrom W, Lindstrom W Fau - Sanner MF, Sanner MF Fau - Belew RK, Belew Rk Fau - Goodsell DS, Goodsell Ds Fau - Olson AJ, Olson AJ, Chem JC (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 30(16):2785–2791

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

Pruijssers, A. J.; Denison, M. R. Nucleoside analogues for the treatment of coronavirus infections. Current Opinion in Virology, [s. 1.], v. 35, Antiviral strategies, p. 57–62, 2019.

Qin X, Zhong J, Wang Y (2021) A mutant T1 lipase homology modeling, and its molecular docking and molecular dynamics simulation with fatty acids. J Biotechnol 337(February):24–34. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.06.024

Ragunathan A, Malathi K, Anbarasu A (2018) MurB as a target in an alternative approach to tackle the Vibrio cholerae resistance using molecular docking and simulation study. J Cell Biochem 119(2):1726–1732. https://doi.org/10.1002/jcb.26333

Rapaport DC (1983) Hydrogen bonds in water network organization and lifetimes. Mol Phys 50(5):1151–1162. https://doi.org/10.1080/00268978300102931

Roe DR, Brooks BR (2020) A protocol for preparing explicitly solvated systems for stable molecular dynamics simulations. J Chem Phys 153(5):1–9. https://doi.org/10.1063/5.0013849

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

Scotti L, Jaime Bezerra Mendonca Junior F, Rodrigo Magalhaes Moreira D, Sobral da Silva M, R. Pitta I, Tullius Scotti M (2013) SAR, QSAR and Docking of Anticancer Flavonoids and Variants: A Review. Curr Top Med Chem 12(24):2785–2809. https://doi.org/10.2174/1568026611212240007

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-(2hydroxy-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

Šponer J, Hobza P, Leszczynski J (1999) Chapter 3 Computational approaches to the studies of the interactions of nucleic acid bases. In: Theoretical and Computational Chemistry. pp 85–117

Struchtrup H (2020) Entropy and the second law of thermodynamics-The nonequilibrium perspective. Entropy 22(7):1–61. https://doi.org/10.3390/e22070793

Tejchman W, Kołodziej P, Kalinowska-Tłuścik J, Nitek W, Żuchowski G, Bogucka-Kocka A, Żesławska E (2022) Discovery of Cinnamylidene Derivative of Rhodanine with High Anthelmintic Activity against Rhabditis sp. Molecules 27(7). https://doi.org/10.3390/molecules27072155

Thind, M.; Kowey, P. R. The Role of the Food and Drug Administration in Drug Development: On the Subject of Proarrhythmia Risk. The Journal of Innovations in Cardiac Rhythm Management, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 3958–3967, 2020.

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

Valent, P.; Groner, B.; Schumacher, U.; Superti-Furga, G.; Busslinger, M.; Kralovics, R.; Zielinski, C.; Penninger, J. M.; Kerjaschki, D.; Stingl, G.; Smolen, J. S.; Valenta, R.; Lassmann, H.; Kovar, H.; Jäger, U.; Kornek, G.; Müller, M.; Sörgel, F. Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine. Journal of Innate Immunity, [s. 1.], v. 8, n. 2, p. 111–120, 2016.

Vemu A, Szczesna E, Zehr EA, Spector JO, Grigorieff N, Deaconescu AM, Roll-Mecak A (2018) Severing enzymes amplify microtubule arrays through lattice GTP-tubulin incorporation. Science (80-) 361(6404):1–12. https://doi.org/10.1126/science.aau1504

Venkatraman RK, Baiz CR (2020) Ultrafast Dynamics at the Lipid-Water Interface: DMSO Modulates H-Bond Lifetimes. Langmuir 36(23):6502–6511. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00870

Wang M, Wang Z, Sun H, Wang J, Shen C, Weng G, Chai X, Li H, Cao D, Hou T (2022) Deep learning approaches for de novo drug design: An overview. Curr. Opin. Struct. Biol. 72

Wright DW, Hall BA, Kenway OA, Jha S, Coveney P V. (2014) Computing clinically relevant binding free energies of HIV-1 protease inhibitors. J Chem Theory Comput 10(3):1228–1241. https://doi.org/10.1021/ct4007037

Xia, X. Domains and Functions of Spike Protein in SARS-Cov-2 in the Context of Vaccine Design. Viruses, [s. 1.], v. 13, n. 1, p. 109, 2021.

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

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

Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; Chen, H.-D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R.-D.; Liu, M.-Q.; Chen, Y.; Shen, X.-R.; Wang, X.; Zheng, X.-S.; Zhao, K.; Chen, Q.-J.; Deng, F.; Liu, L.-L.; Yan, B.; Zhan, F.-X.; Wang, Y.-Y.; Xiao, G.-F.; Shi, Z.-L. Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature, [s. 1.], v. 588, n. 7836, p. E6, 2020.