



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
COORDENAÇÃO DO CURSO DE
LICENCIATURA EM QUÍMICA



NATANAEL FERREIRA DE ALENCAR

ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS NAFTOQUINÔNICOS POTENCIAIS
INIBIDORES DA PRINCIPAL PROTEASE DO SARS-CoV-2

Recife
2020

NATANAEL FERREIRA DE ALENCAR

**ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS NAFTOQUINÔNICOS POTENCIAIS
INIBIDORES DA PRINCIPAL PROTEASE DO SARS-CoV-2**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Licenciatura Plena em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito necessário à obtenção de título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof^o Dr. Celso de Amorim Camara.

Recife
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A354e Alencar, Natanael Ferreira de
Estudo in silico de derivados naftoquinônicos potenciais inibidores da principal protease do SARS-CoV
2 / Natanael Ferreira de Alencar. - 2020.
57 f. : il.
- Orientador: Celso de Amorim Camara.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Química, Recife, 2020.
1. COVID-19. 2. Inibidor Enzimático. 3. Docking molecular. 4. Modelagem Molecular. 5. Naftoquinonas.
I. Camara, Celso de Amorim, orient. II. Título

CDD 540

NATANAEL FERREIRA DE ALENCAR

**ESTUDO *IN SILICO* DE DERIVADOS NAFTOQUINÔNICOS POTENCIAIS
INIBIDORES DA PRINCIPAL PROTEASE DO SARS-CoV-2**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Licenciatura Plena em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito necessário à obtenção do grau de licenciado em Química pela banca examinadora representada pelos membros:

Aprovada em: 05 de novembro 2020.

Orientador

Prof. Dr. Celso de Amorim Camara (DQ - UFRPE)

Examinador

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire (CBiotec - UFPB)

Examinador

Prof. Dr. Luciano de Azevedo Soares Neto (DQ - UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe Lúcia, por todo apoio proporcionado durante a trajetória de vida e por toda a graduação.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Celso de Amorim Camara, que me recebeu de portas abertas como orientando, sendo assim agradeço a paciência e boa vontade como orientador, professor e colega de trabalho e trajetória científica.

Dedico também a todos os meus amigos que fizeram parte da minha trajetória acadêmica e de vida, especialmente a minha turma de graduação composta por Arthur, Carol, Maria, Raphaela, Libna, Danylo, André e Camila. Também meus amigos e companheiros Chico, Arthur e Luidje, a todos que me estiveram comigo nesta importante fase da vida em bons momentos e nos momentos mais difíceis.

Também a todos os colegas do Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos, que me receberam de forma calorosa e especialmente a Ingrid Trajano que tanto me ensinou e teve enorme paciência e disposição, por ultimo agradeço a todos os docentes e servidores do Departamento de Química da UFRPE.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa que afeta principalmente os pulmões, foi identificada primeiramente na China e rapidamente se espalhou ao redor do globo se configurando numa grande pandemia. O agente causador da doença é um novo vírus da família coronaviridae, identificado como SARS-CoV-2. Diversos pesquisadores tem investigado modos de combater o vírus, fazendo uso da pesquisa *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Dentre as técnicas *in silico* a modelagem molecular é um forte aliado para a descoberta de novos fármacos e para a investigação dos modos como as moléculas interagem com os receptores biológicos, a principal e mais difundida dessas técnicas é o docking molecular e os métodos de otimização molecular por mecânica quântica. As naftoquinonas são um grupo químico encontrado em diversos grupos vegetais, dentre elas o lapachol, α -lapachona e β -lapachona tem ganhado atenção por suas propriedades anticâncer, antiinflamatórias, bactericidas e até antiviral. Este trabalho tem como objetivo utilizar a modelagem molecular com 11 isômeros derivados da α -lapachona, β -lapachona e o lapachol para verificar a eficácia inibitória frente a principal protease do SARS-CoV-2. Os métodos computacionais foram a modelagem das 11 moléculas por método semiempírico PM7 e a realização do docking molecular com a estrutura cristalográfica da enzima depositada no banco de dados PDB sob o código 6W79. Os resultados mostraram que os isômeros derivados da α -lapachona apresentaram menores energias de formação e total, melhores energias de afinidade frente a enzima. Os melhores ligantes foram os compostos que apresentam o grupo nitro e ácido sulfônico em suas estruturas, sendo o **1d**, **2d**, **1e** e **2e** obtiveram melhores energias de interação com a principal protease do SARS-CoV-2. **1d** obteve $-7,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, o **2d** obteve $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, **1e** obteve $-8,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o **2e** obteve $-8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Os resultados obtidos foram mais promissores do que resultados obtidos a partir da literatura com os principais medicamentos usados no tratamento da COVID-19 como a hidroxicloroquina e a azitromicina. Com isso, concluímos que as naftoquinonas são potenciais inibidores da principal protease do vírus SARS-CoV-2, desta forma este trabalho abre caminho para posteriores testes biológicos destas moléculas.

Palavras-chave: COVID-19. Inibidor enzimático. Docking molecular. Modelagem molecular. Naftoquinonas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírion (subfamília Coronavirineae).....	12
Figura 2: Distribuição global dos casos confirmados de COVID-19.....	13
Figura 3: Ciclo de replicação do SARS-CoV-2.....	14
Figura 4: a. Organização do genoma do SARS-CoV-2. b. Representação dos pontos de clivagem pelas proteases.....	15
Figura 5: Estrutura da M ^{pro} do SARS-CoV-2 PDB 6W79 com destaque para o ligante X77 no sítio ativo.....	16
Figura 6: Interações entre o ligante X77 cristalizado e os aminoácidos do sítio ativo da M ^{pro} SARS-CoV-2 PDB 6W79.....	16
Figura 7: Mecanismo da catálise proteolítica da M ^{pro} SARS-CoV-2.....	17
Figura 8: Estrutura do lapachol.....	18
Figura 9: Estrutura dos isômeros alfa-lapachona e beta-lapachona.....	19
Figura 10: Processo de ancoramento molecular.....	23
Figura 11: Métrica de validação da estrutura cristalográfica da Principal Protease do SARS-CoV-2 PDB ID 6W79.....	25
Figura 12: Ligantes usados neste estudo.....	26
Figura 13: Parâmetros e valores necessários para o local de ancoramento na proteína.....	27
Figura 14: Visão da grid box no sítio ativo da principal protease do SARS-CoV-2....	28
Figura 15: Estruturas ionizadas em pH fisiológico de 7,4.....	30
Figura 16: Estruturas dos ligantes otimizadas por PM7 no MOPAC2016.....	31
Figura 17: Estruturas dos ligantes evidenciando os orbitais HOMO.....	35
Figura 18: Estrutura dos ligantes evidenciando os orbitais LUMO.....	36
Figura 19: Superfície de potencial eletrostático dos ligantes.....	37
Figura 20: Sobreposição do ligante X77 co-cristalizado em azul e o ligante obtido por docking em amarelo, RMSD=0,856Å.....	38
Figura 21: Interações entre o lapachol e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	40
Figura 22: Diagrama 2D obtido com o software LigPlot+ de interações do lapachol com o sítio ativo da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	41
Figura 23: União de todos os ligantes no sítio ativo da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	42

Figura 24: Gráfico que relaciona as energias de afinidade e constante de inibição teórica dos 11 ligantes estudados.....	42
Figura 25: Interações 3D e diagrama 2D do composto 1a (α -lapachona) com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	43
Figura 26: Interações 3D e diagrama 2D do composto 2a (β -lapachona) com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	44
Figura 27: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 1b com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	44
Figura 28: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 2b com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	45
Figura 29: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 1c com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	46
Figura 30: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 2c com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2.....	46
Figura 31: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 1d com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2, tracejado amarelo no anel representam interações do tipo π -stacking e os oxigênios do grupo nitro fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo Gly143, $\Delta G_{lig}=-7,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$	48
Figura 32: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 2d com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2, tracejados amarelos representando ligações de hidrogênio com a Thr25, His41, Gly189 e Tyr54, $\Delta G_{lig}=-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$	48
Figura 33: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 1e com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2, tracejados mostrando ligações de hidrogênio com a Tyr25, His41, Tyr54 e Gly189, $\Delta G_{lig}=-8,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$	49
Figura 34: Interações 3D e diagrama 2D do ligante 2e com os resíduos dos aminoácidos da M ^{pro} do SARS-CoV-2, tracejados amarelos representam ligações de hidrogênio com Thr25, Tyr54, Arg188 e Gly189, $\Delta G_{lig}=-8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das quinonas.....	18
Tabela 2: Parâmetros de configuração.....	29
Tabela 3: Propriedades obtidas a partir de cálculo semi-empírico com PM7.....	32
Tabela 4: Energia de ligação e constante de inibição teórica para os 11 ligantes naftoquinônicos.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 GERAL.....	11
2.2 ESPECÍFICOS.....	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 FAMÍLIA CORONAVIRIDAE.....	12
3.2 COVID 19.....	13
3.1.1 Epidemiologia.....	13
3.1.2 Replicação do SARS-CoV-2.....	14
3.2 PRINCIPAL PROTEASE DO SARS-CoV-2.....	15
3.3 NAFTOQUINONAS DE INTERESSE.....	17
3.3.1 QUINONAS.....	17
3.3.2 LAPACHOL.....	18
3.3.3 β -LAPACHONA.....	19
3.4 MODELAGEM MOLECULAR EM QUÍMICA MEDICINAL.....	19
3.5 INTERAÇÕES RECEPTOR-LIGANTE.....	21
3.6 DOCKING MOLECULAR.....	21
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 ESCOLHA DA ESTRUTURA DO RECEPTOR.....	25
4.2 TRATAMENTO DO RECEPTOR.....	25
4.3 DESENHO E OTIMIZAÇÃO DOS LIGANTES.....	26
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOCKING.....	27
4.5 DOCKING MOLECULAR.....	28
4.6 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES.....	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 ESTRUTURAS OTIMIZADAS.....	30
5.2 ANÁLISE DO <i>REDOCKING</i>	38
5.3 ANÁLISE DO DOCKING E INTERAÇÕES INTERMOLECULARES.....	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A síndrome respiratória aguda do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é uma doença respiratória que teve origem em Wuhan na China. A doença foi nomeada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de COVID-19 [1]. O agente etiológico da doença foi identificado por chineses e os sintomas aparecem principalmente como falta de ar, tosse e febre ou até mesmo a ausência de sintomas [2].

A problemática estendeu-se por todo o globo, o que configurou uma pandemia de grande magnitude, dados atuais da World Health Organization (WHO) indicam números alarmantes de 27.738.179 casos confirmados, incluindo 899.916 mortes [3].

Diversos pesquisadores ao redor do mundo tem investigado métodos de controle da doença, seja por busca de vacinas, *virtual screening* para investigar efeitos de medicamentos já no mercado, produtos naturais, de síntese e semi-síntese; estudos *in vitro*, *in vivo* em animais. De acordo com a estrutura e ciclo de infecção do vírus são planejados as moléculas a serem testadas, são alvos estruturais a principal protease de grande importância no ciclo, a espícula que se liga a enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) [4].

As quinonas são uma ampla gama de metabólitos secundários presentes em diversas espécies de plantas. Diversos estudos tem mostram que tais compostos apresentam atividades farmacológicas, tais como, atividade microbicidas, tripanossomicidas, virucidas e antitumorais [5].

Um subgrupo das quinonas de interesse sintético são as naftoquinonas, entre as naftoquinonas o lapachol vem sendo utilizado como *template* na obtenção de novas moléculas. O lapachol é uma fonte abundante e isso facilita seu uso em laboratório. O lapachol é facilmente encontrado nas *Tabebuias*, que são plantas da família Bignoniaceae, no Brasil mais conhecidas como ipês, caraíba ou craibas[6].

A síntese do lapachol pode ser realizada a partir da lausona (2-hidróxi-1,4-naftoquinona) com a qual pode ser feita uma alquilação com brometo de prenila em meio básico [7] e obtendo o lapachol que apresenta uma dupla ligação em sua cadeia lateral. Em meio ácido forte pode ocorrer ciclização e forma-se a β -lapachona, que apresenta inúmeras atividades biológicas; e em ácido fraco é formado a α -lapachona [7].

Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de funcionalizar as naftoquinonas, buscando desta forma novas moléculas candidatos a fármacos, e diversas

reações são conhecidas utilizando em especial adição de reagentes eletrofílicos e nucleofílicos ao núcleo das quinonas. São conhecidas reações de ciclização em meio ácido, halogenação e sulfonação [8-10], entre outras.

A Química Medicinal moderna dispõe de diversas ferramentas experimentais e teóricas, que auxiliam na descoberta de novas moléculas bioativas. Uma forma de buscar por novos candidatos a fármacos é o estudo da interação que as moléculas tem com seus receptores, sendo assim, poder planejar novas moléculas que irão se ligar com o receptor desejado. Esta ideia tem como princípio a relação chave e fechadura, onde a molécula será a “chave” e o receptor a “fechadura” [11,12].

O planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor (*structure-based drug design*, SBDD) tem como intenção investigar as interações intermoleculares que a molécula tem pelo sítio ativo do receptor alvo. Uma das principais técnicas empregadas para tal é o ancoramento molecular (do inglês, *molecular docking*), técnica que procura pela melhor posição e menor energia de interação de receptores com moléculas pequenas (proteína-ligante) e receptores com outras proteínas (proteína-proteína) [13,14].

A atual necessidade por novas moléculas candidatas a fármacos contra o COVID 19 e a extensa quantidade de produtos naturais e possibilidades de semi-sínteses possibilitou a seguinte questão:

Derivados naftoquinônicos podem ser utilizados como inibidores da principal protease do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19?

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho tem como objetivo Investigar por *docking* molecular derivados cíclicos do lapachol como possíveis inibidores da principal protease do coronavírus, bem como os modos de interação com o sítio ativo da enzima.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar propriedades eletrônicas dos ligantes por método quântico semi empírico;

Realizar cálculos computacionais de *docking* molecular com cada um dos ligantes;

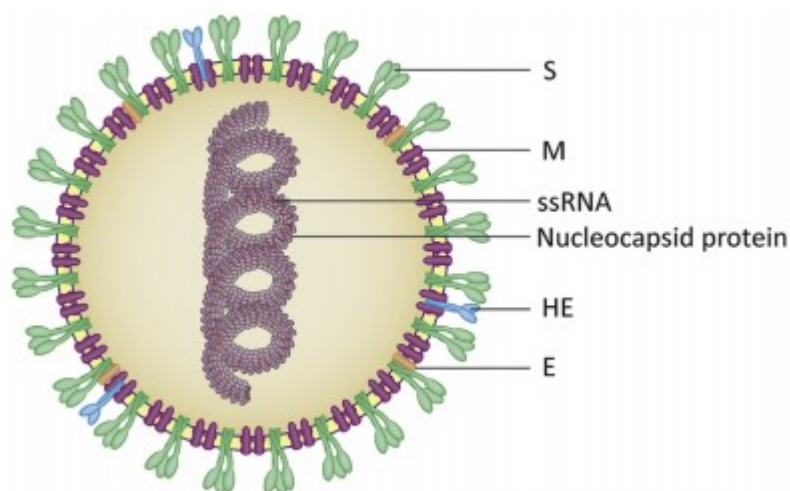
Avaliar as interações intermoleculares dos ligantes com o sítio ativo da proteína, energias de afinidade proteína-ligante, bem como a concentração teórica de inibição (K_i).

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FAMÍLIA CORONAVIRIDAE

A família *Coronaviridae* foi reconhecida como família em 1968, o nome se deve a característica de sua morfologia. Características de seu genoma, estratégia de replicação, proteínas e outros elementos internos corroboraram para sua classificação [15]. Os coronavírus são amplamente conhecidos, tendo seus genomas variando de 25 a 32 mil pares de bases e suas dimensões são da ordem de 118 a 136 nm de diâmetro. Os coronavírus são esféricos e apresentam em sua superfície glicoproteínas em forma de espinhos, dando sua característica de coroa, como pode ser visto na figura 1 [16].

Figura 1: Estrutura do vírion (subfamília Coronavirineae)



Fonte: Adaptada da referência [16].

A família é composta por duas subfamílias Coronavirineae e Torovirineae, sendo a primeira com envelope flexível e a segunda com envelope em formato de toroide, seu material genético é composto por RNA em fita simples e positiva (+ssRNA) [16].

Os coronavírus (CoVs) são de grande importância médica, pois desempenham ação como patógenos para humanos e outros vertebrados, podem infectar os sistemas hepático, respiratório, gastrointestinal e sistema nervoso central em morcegos, humanos, ratos entre outros animais [17].

3.2 COVID 19

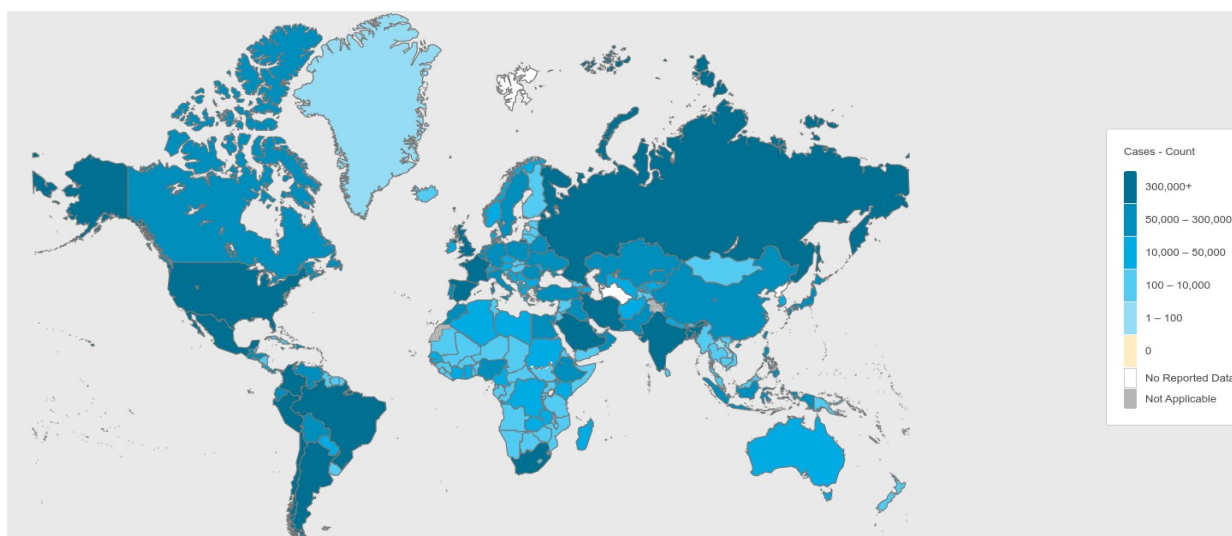
No final do ano de 2019 múltiplos casos foram relatados de uma nova infecção respiratória por coronavírus em um mercado de pescados na cidade de Wuhan na China. A princípio acharam que se tratava de uma nova onda de contaminação do já conhecido SARS-CoV, que em 2002 infectou 8422 pessoas e matou 916. Por causa de sua fácil transmissão e graves problemas associados, não demorou muito para que se tornasse um problema mundial, afetando a saúde de diferentes povos e causando prejuízos aos diferentes setores das economias globais [18].

3.1.1 Epidemiologia

A forma de transmissão pode ser de uma pessoa sintomática para outra ou de uma pessoa assintomática para outras. A infecção de humano para humanos ocorre por meio de contato com as gotículas de saliva da pessoa contaminada, ou contato indireto em uma superfície que contenha as partículas virais. Inicialmente os coronavírus afetavam animais, como pássaros e mamíferos podendo causar a morte dos mesmos, desta forma afetando o setor agropecuário. Foi encontrado coronavírus em morcegos que agem de forma semelhante aos encontrados em humanos, eles se ligam a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) [19].

Os casos atuais são bastante alarmantes de acordo com a WHO, mais de 27 milhões de casos reportados pelo mundo, presente em todos os continentes, dados do período de setembro de 2020 no Brasil são reportados mais de 4 milhões de casos confirmados e mais de 127 mil mortes em decorrência da COVID-19, a figura 2 dá um panorama geral da distribuição global [3].

Figura 2: Distribuição global dos casos confirmados de COVID-19



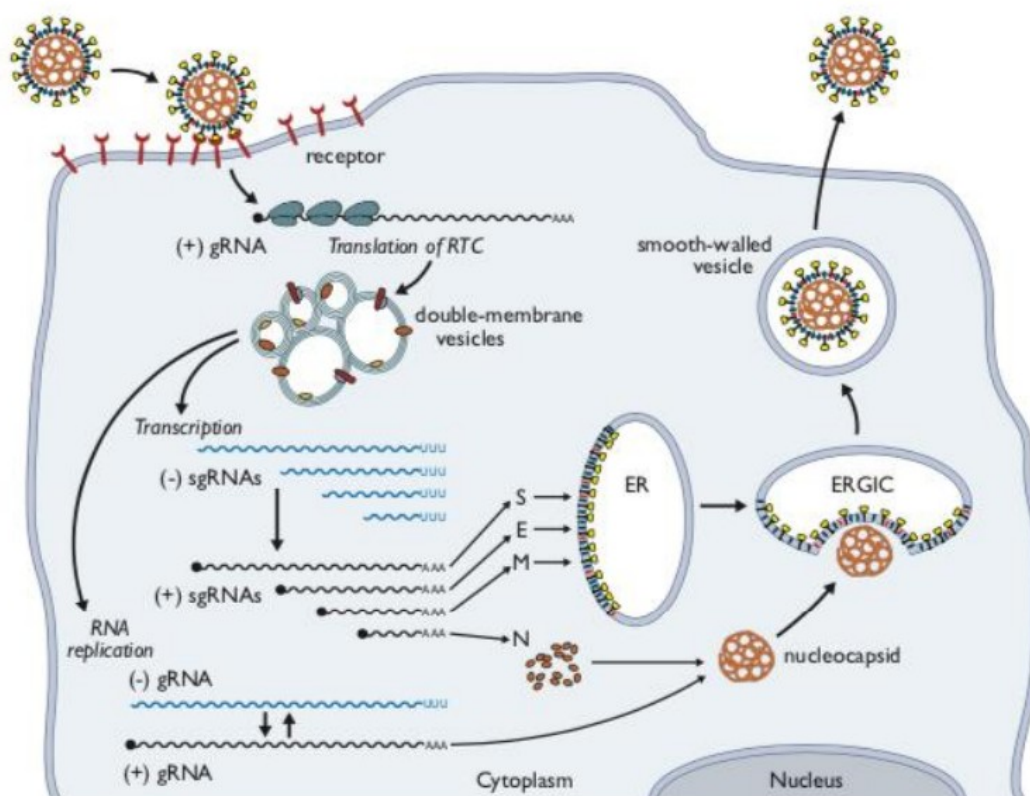
Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2020 [3].

3.1.2 Replicação do SARS-CoV-2

O ciclo de replicação do vírus ocorre em quatro etapas [20]. O vírus acopla a superfície celular através da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), após o reconhecimento do receptor e a proteína S, a estrutura do vírus entra na célula por endocitose e então a estrutura é clivada por lisossomo, desta forma o material genético é exportado ao citoplasma.

O RNA viral acopla ao ribossomo celular e começa a tradução e expressão de genes de replicação, então serão produzidos os polipeptídeos pp1a e pp1ab, estes polipeptídeos são processados pela protease viral para se transformarem em um complexo RNA replicase-transcriptase (RTC). A RTC direciona a síntese do -RNA e replicação em +RNA, o +RNA apresenta os códigos para todas as proteínas estruturais do vírus [21]. Usando do aparato celular o vírus produz o RNA e as proteínas estruturais que darão origem a novos vírus, a figura 3 esquematiza o processo de replicação do vírus.

Figura 3: Ciclo de replicação do SARS-CoV-2

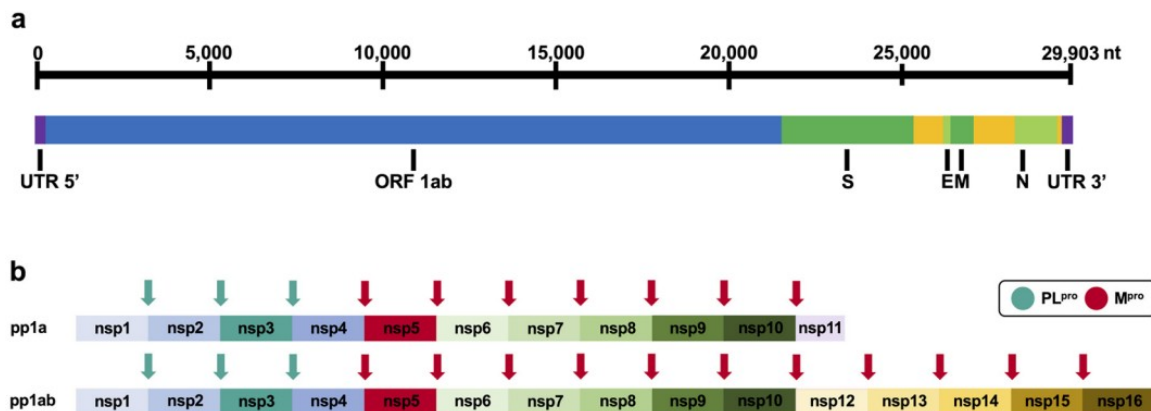


Fonte: Sociedad Argentina de Virología [21].

3.2 PRINCIPAL PROTEASE DO SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado e em sua estrutura externa e interna é composta por várias proteínas não estruturais e estruturais. O gene ORF 1ab codifica duas grandes proteínas pp1a e pp1ab, estas duas poliproteínas são quebradas em 16 proteínas menores nsp1 a nsp16, essas quebras são catalisadas pela principal protease M^{pro} e pela protease do tipo papaína PL^{pro} . O restante dos genes codificam outras proteínas estruturais como a glicoproteína (S) em forma de espinho na superfície do vírus, proteína do envelope (E), a proteína de membrana (M) e a fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) [22].

Figura 4: a. Organização do genoma do SARS-CoV-2. b. Representação dos pontos de clivagem pelas proteases.

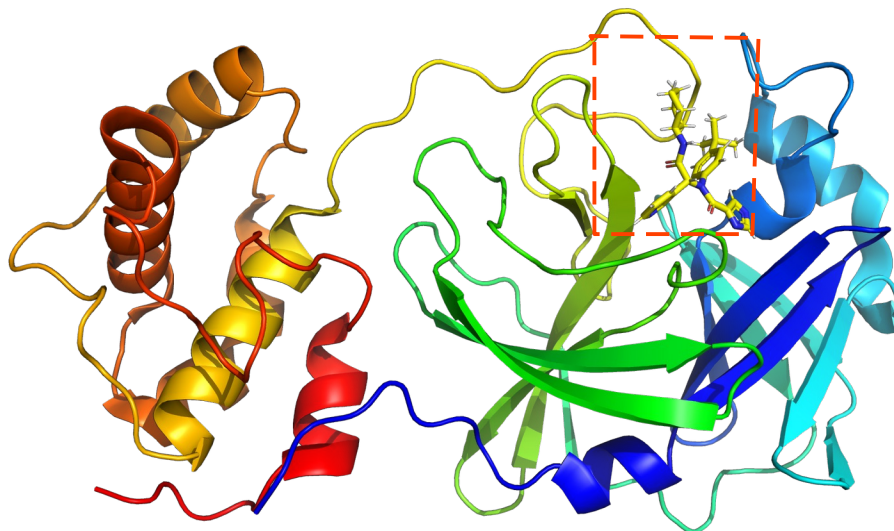


Fonte: Adaptada de [22].

Tendo em vista a estrutura e o ciclo de replicação viral, diversos pesquisadores buscam por novas vacinas e moléculas que combatam o coronavírus. Os principais alvos são a proteína da espícula S, que é responsável pelo acoplamento do vírus na superfície celular através da ACE2, a polimerase dependente de RNA (RdRp e nsp12), NTPase (nsp13), PL^{pro} e M^{pro} [22].

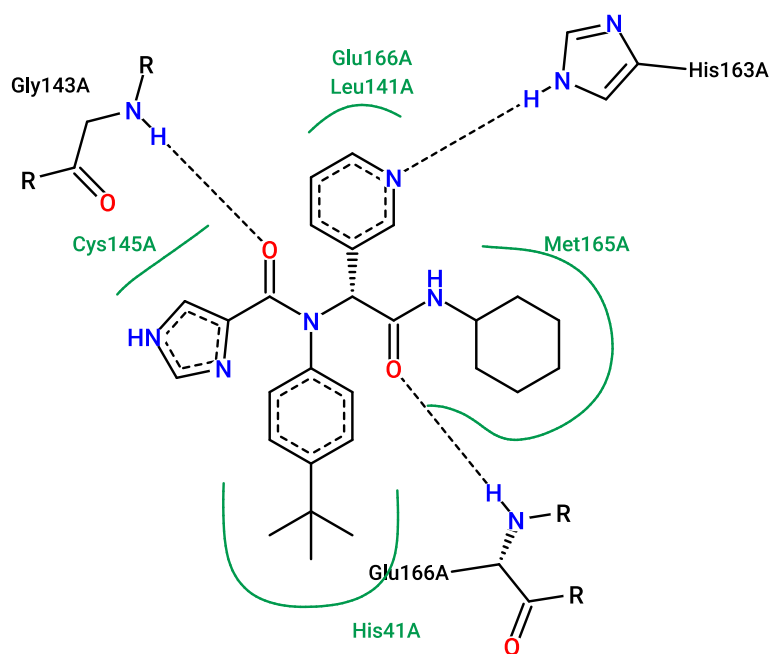
A estrutura da M^{pro} apresenta relações próximas com outros coronavírus, além de que sobreposição de estruturas determinadas por difração de raios-x mostram elevada semelhança entre SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV [22,23].

Figura 5: Estrutura da M^{pro} do SARS-CoV-2 PDB 6W79 com destaque para o ligante X77 no sítio ativo.



Fonte: O autor.

Figura 6: Interações entre o ligante X77 cristalizado e os aminoácidos do sítio ativo da Mpro SARS-CoV-2 PDB 6W79.

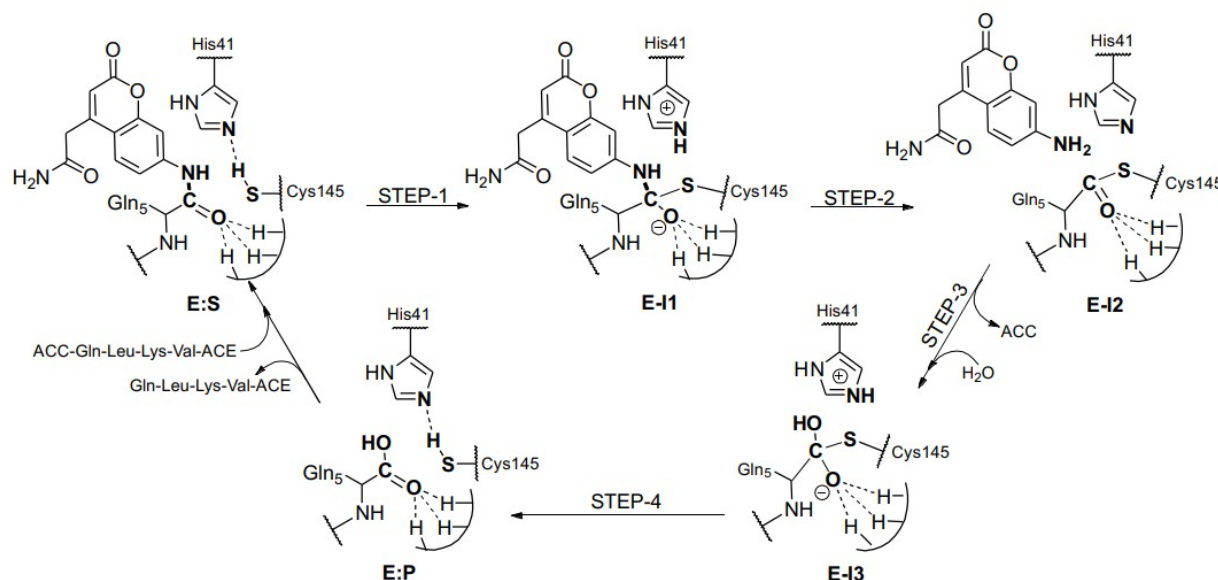


Fonte: O autor.

No sítio ativo da proteína se destacam principalmente dois resíduos de aminoácidos que estão diretamente relacionados com a atividade catalítica de quebra de ligações peptídicas, são eles a Cisteína 145 e a Histidina 41, apesar de que os resíduos próximos

são associados com a função, principalmente com ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, tais resíduos são importantes também para a estabilidade do ligante no sítio catalítico [23].

Figura 7: Mecanismo da catálise proteolítica da M^{pro} SARS-CoV-2.



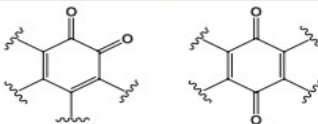
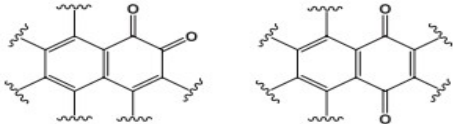
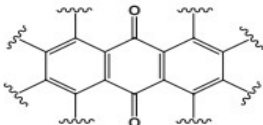
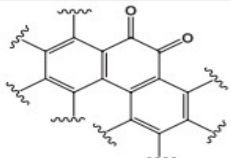
Fonte: Swiderek & Moliner, 2020 [28].

3.3 NAFTOQUINONAS DE INTERESSE

3.3.1 QUINONAS

As quinonas são um grupo de metabólitos secundários encontradas em inúmeras plantas e organismos, são classificadas como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos oxigenados. De acordo com o sistema aromático as quinonas podem ser benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e mais raramente fenantraquinonas [24].

Tabela 1: Classificação das quinonas

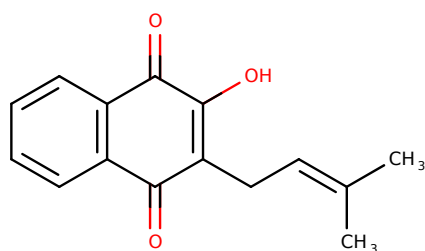
Grupo	Sistema aromático	Estruturas Básicas
1. Benzoquinonas	→ Anel benzênico	
2. Naftoquinonas	→ Anel naftalênico	
3. Antraquinonas	→ Anel antracênico	
4. Fenantraquinonas	→ Anel fenantrênico	

Fonte: Adaptada de [24].

As quinonas possuem grande importância, tanto do ponto de vista toxicológico, quanto do seu uso farmacológico. Uma característica importante das quinonas é de serem oxidantes e eletrofílicas, o que confere atuação em ciclos redox e de reações de Michel [24].

3.3.2 LAPACHOL

O lapachol é uma naftoquinona encontrada nas plantas da família Bignoniaceae, popularmente conhecidos como ipês, o lapachol é extraído dos troncos dessas árvores. Possui diversas propriedades já relatadas na literatura, como anti-inflamatória, analgésica, tripanocida, antimalária, antibiótica ainda possuindo ação antiviral e anticâncer [25].

Figura 8: Estrutura do lapachol

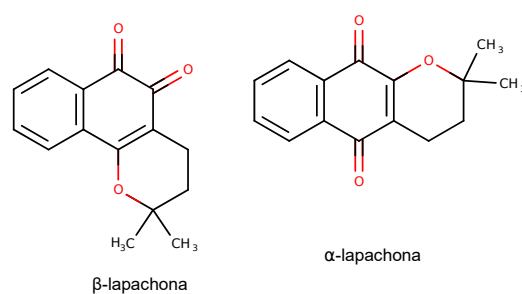
Fonte: O autor.

O lapachol é conhecido desde 1882 e teve sua estrutura elucidada em 1896 por S.C. Hooker, sendo identificado como 2-hidroxi-3-(*e*-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. Com o devido controle do calor e pH podem ser obtidos a xiloidona e os isômeros α -lapachona e β -lapachona [25, 26].

3.3.3 β -LAPACHONA

A β -lapachona assim como a α -lapachona é um dos isômeros do processo de ciclização do lapachol. Quimicamente é 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-*b*]pirano-5,6-diona. Assim como o lapachol, a β -lapachona pode ser extraída do cerne de tronco plantas *Tabebuia avellandae*, porém em menor quantidade se relacionada ao lapachol. Encontram-se relatadas na literatura vasta gama de aplicações farmacológicas, apresentando ainda maior poder de atividade do que o lapachol e do isômero α -lapachona, por isso os pesquisadores buscam por novas atividades, bem como sugerem modificações estruturais a partir de processos semissintéticos com intuito de potencializar alguma atividade específica em suas aplicações [5,7,27].

Figura 9: Estrutura dos isômeros alfa-lapachona e beta-lapachona.



Fonte: O autor.

3.4 MODELAGEM MOLECULAR EM QUÍMICA MEDICINAL

Uma importante área da química é a modelagem molecular, onde é possível representar, entender e inferir propriedades da matéria se baseando em leis clássicas e quânticas da física e da química. Considerando a complexidade dos fenômenos naturais e suas inúmeras variáveis, a modelagem foca em determinadas características e isolam

sistemas para melhor entendimento de fatos locais acerca do que se pretende investigar. Sendo assim a modelagem se ocupa de modelos teóricos para representar moléculas, reações químicas e estrutura da matéria [29]. A Modelagem Molecular (MM) e suas representações permitem ainda verificar aspectos tridimensionais de reconhecimento molecular, auxiliando o planejamento e síntese de novos compostos bioativos. A MM pode ser aplicada ao planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (do inglês SBDD, *structure based drug design*) e também baseado na estrutura do ligante (Ligand-based drug design), principalmente quando se conhece a estrutura do receptor, sendo assim possível planejar análogos estruturais de ligantes que tenham maior afinidade pelo sítio de ligação [30].

A MM se desenvolveu muito nos últimos anos, graças ao maior poder computacional, melhores softwares, avanços em química computacional, bem como maior difusão e avanços em métodos experimentais como a cristalografia de raios-x, bioquímica, biologia molecular e ressonância magnética nuclear [31].

Dentro da MM são empregados métodos clássicos como a mecânica molecular e métodos quânticos, como os *ab initio* e semi-empíricos. A mecânica molecular apoia-se na descrição clássica das moléculas, considerando a estrutura das moléculas como esferas ligadas por molas. Os fundamentos da mecânica molecular são as leis de Newton, os campos de força levam em conta comprimentos de ligação, ângulos, distâncias de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e semelhantes [11,31].

A mecânica quântica apresenta um maior refinamento nos parâmetros, leva em conta a estrutura eletrônica, por outro lado exige um maior custo computacional. Os métodos semi-empíricos assim como os métodos de mecânica molecular utilizam parâmetros experimentais para poder diminuir o número de integrais a serem calculadas, porém também utilizam o formalismo do método Hartree-Fock da mecânica quântica. Um dos principais softwares usados neste campo é o MOPAC e as aproximações de hamiltonianos parametrizados como MNDO, ZINDO, AM1, PM3, RM1 e PM7 [55].

Dentro do escopo da modelagem molecular aplicada Química Medicinal são usados diversas metodologias, dentre elas podemos destacar a modelagem de proteínas quando a mesma não possui determinação experimental por RMN ou difração de raios-x, dinâmica molecular, ancoragem molecular (*docking*), QSAR entre outras. Os métodos computacionais são de grande importância na pesquisa e desenvolvimentos de fármacos e servem como complemento para os métodos experimentais, ajudando o profissional da

área a entender melhor a nível molecular a relação entre fármacos e seus receptores [11,32].

3.5 INTERAÇÕES RECEPTOR-LIGANTE

As interações receptor-ligante foram inicialmente propostas por Emil Fischer ainda no século XIX, fazendo uma alusão à relação mecânica chave-fechadura, onde o ligante seria a chave e o receptor a fechadura. Apesar de simples, explica bem a relação espacial e de conformação que a molécula deve apresentar para poder se encaixar em um sítio específico do receptor que podem ser enzimas, DNA ou outros receptores celulares. A teoria de interação ligante e receptor foi extrapolada para o entendimento entre os fármacos e seus sítios de ligação. Mesmo a teoria tendo uma vasta gama de aplicações só explica parcialmente o processo, pois considera apenas a conformação da molécula e seu encaixe perfeito, sem levar em conta parâmetros de flexibilidade da molécula, bem como do receptor. Um melhoramento na teoria foi feito por Koshland introduzindo o conceito de encaixe induzido, onde o receptor ao se ligar com o substrato mudaria sua conformação e assim sua atividade seria realizada, no caso de uma enzima sua atividade catalítica seria favorecida [33].

Além da complementaridade e flexibilidade dos ligantes e da estrutura receptora, as interações intermoleculares são mediadas por forças que favorecem ou desfavorecem a forma como os ligantes irão interagir com o sítio ativo de uma enzima, por exemplo. As forças são de caráter basicamente eletrostático, como interações íon-dipolo ou íon-íon, além de forças de van der Waals. São comuns alguns tipos de interações, como as ligações de hidrogênio que são as de maior importância nos meios biológicos, pois são responsáveis pelas estruturas das proteínas como as alfa-hélices e folhas beta pregueadas, além da estrutura do DNA e as interações de maior energia dentro dos locais de interação com o ligantes. Ainda são citadas interações menos comuns como as ligações de halogênio, interações cátion-pi, ânion-pi, empilhamento entre pi-pi e interações hidrofóbicas [34,35].

3.6 DOCKING MOLECULAR

Dentro da área design racional de fármacos baseados na estrutura, as técnicas computacionais de *docking* molecular ou ancoramento molecular são as mais amplamente utilizadas na indústrias farmacêuticas e academia com importantes resultados. Para a realização de tais estudos estão disponíveis diversos softwares de docking pagos e gratuitos, como o GOLD, Autodock4, Autodock Vina, GLIDE, Flexx, Molegro Virtual Docker; também estão disponíveis acessos a programas de docking por meio de sites na internet como o DockThor do Laboratório Nacional de Computação Científica e o SwissDock [14,35,36,37].

O ancoramento molecular se baseia na busca da conformação de menor energia do ligante no receptor. Existem três principais objetivos a serem realizados, predição da pose, *virtual screening* e estimativa da energia de afinidade receptor-ligante que é estimada pela energia livre de Gibbs de ligação (ΔG_{lig}) de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K_{eq} \quad (1.1)$$

onde ΔH é a variação da entalpia, T é a temperatura absoluta em Kelvin, ΔS é a variação de entropia, R é a constante universal dos gases e K_{eq} é a constante de equilíbrio de ligação de uma possível reação.

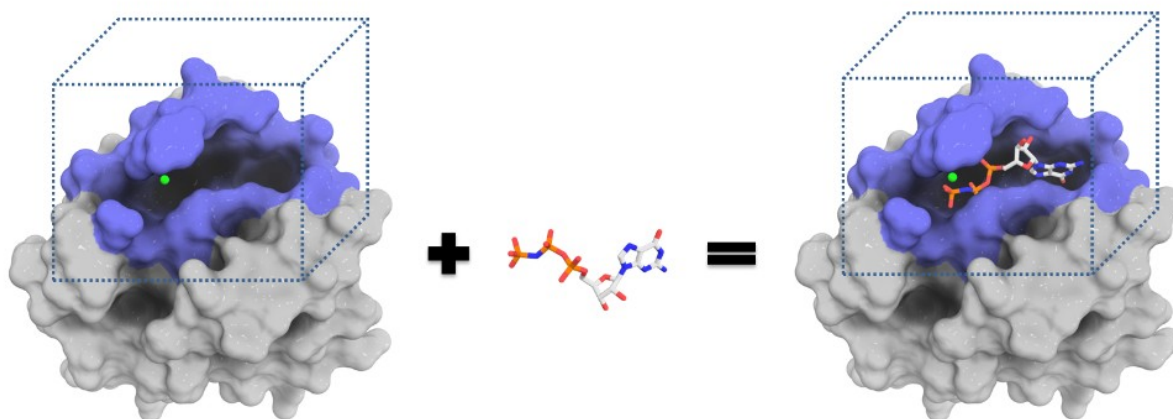
Um bom método de *docking* molecular deve conseguir achar a conformação correta do ligante no sítio ativo do receptor, deve ser capaz de achar a pose idêntica de um ligante cristalizado ao seu receptor. Além disso, ser capaz de em uma extensa biblioteca de ligantes separar os que tem maior afinidade dos que tem menor afinidade pelo receptor, método chamado de *virtual screening* [14].

Para poder alcançar os objetivos pretendidos os programas de ancoramento molecular fazem usos de parâmetros codificados em seus algoritmos. Os principais parâmetros são os algoritmos de busca e as funções de pontuação ou *scoring*. Os algoritmos de busca procuram em diversas possibilidades os mínimos locais e globais de energia, levando em conta entidades termodinâmicas como entalpia e entropia do sistema, se o processo funciona, o mínimo global de energia deve coincidir com o resultado experimental [14]. Os principais algoritmos de busca usados são baseados em computação bioinspirada, como Algoritmos Evolucionários, além de algoritmos estocásticos baseados em Monte Carlo, dentre outros [37].

Os algoritmos de busca geram uma grande quantidade de conformações dos ligantes. Nos softwares de docking também são implementadas funções de avaliação ou *scoring*,

essas funções tem como princípio fazer um ordenamento das poses de acordo com suas energias de afinidade pelo receptor, além disso as funções devem ser capazes de boa previsão do modo de ligação mais adequado, quando comparados com os obtidos experimentalmente por difração de raios-x, por exemplo. As funções de *scoring* são modelos matemáticos com diferentes termos de propriedades físico-químicas que se referem as interações dos ligantes com o sítio de ligação do receptor. As funções de avaliação ainda podem ser classificadas em: baseadas em campo de força, empíricas e em conhecimento. As baseadas em campo de força possuem termos clássicos ou quânticos, como interações de van der Waals, eletrostáticos, ligações de hidrogênio e torções de ligações químicas. As empíricas são baseados em aprendizagem de máquina, usando diversas estruturas determinadas experimentalmente como parâmetro, as baseadas em conhecimento fazem uso de mecânica estatística empregando potenciais de força média [38].

Figura 10: Processo de ancoramento molecular.



Fonte: Portal DockThor [39].

Uma forma de avaliar a qualidade do método de docking molecular é realizar o processo de *redocking*. O *redocking* consiste em fazer o *docking* com o próprio ligante cristalizado junto com a estrutura a ser estudada, para isso o ligante é removido da estrutura e é feito o cálculo de atracamento deste ligante e a proteína. O resultado obtido é então comparado a conformação original por sobreposição e é também obtido o parâmetro desvio quadrático médio RMSD (*Root Mean Square Deviation*). O RMSD é uma medida de distância dos átomos de cada uma das moléculas comparadas, o valor

ideal de RMSD seria 0,00 Å, porém diversos autores consideram o valor aceitável $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ [40].

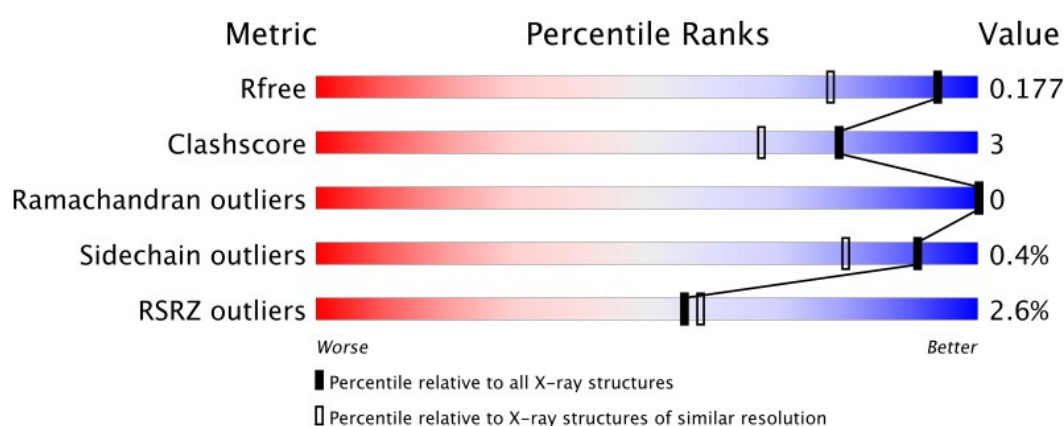
4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado em um computador com sistema operacional Linux Ubuntu 18.04.5 LTS, hardware com processador i3 de 2,53 GHz, 8 GB de memória RAM e armazenamento SSD de 128 GB. O trabalho seguiu uma ordem de atividades computacionais que serão descritas ao longo da metodologia.

4.1 ESCOLHA DA ESTRUTURA DO RECEPTOR

A estrutura escolhida foi a *Structure of SARS-CoV main protease bound to potent broad-spectrum non-covalent inhibitor X77*, determinada experimentalmente por Difração de Raios-X (XRD) com uma resolução de 1,46 Å depositada no banco de dados *Protein Data Bank* sob o código PDB ID 6W79. A qualidade da estrutura foi analisada de acordo com a resolução e parâmetros experimentais de validação de estruturas disponíveis no PDB.

Figura 11: Métrica de validação da estrutura cristalográfica da Principal Protease do SARS-CoV-2 PDB ID 6W79.



Fonte: <https://www.rcsb.org/structure/6W79>

4.2 TRATAMENTO DO RECEPTOR

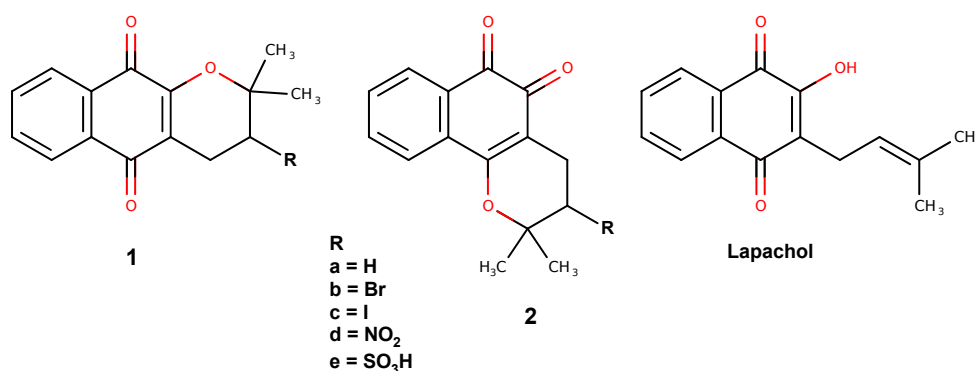
A estrutura do receptor obtida por cristalografia precisa ser tratada antes da simulação, para tal, foi usado o software AutoDockTools (ADT) versão 1.5.6 [41]. A estrutura obtida

do banco de dados PDB no formato .pdb determinada por XRD não apresenta os átomos de hidrogênios, desta forma foi adicionado apenas os hidrogênios polares à estrutura da proteína, as moléculas de água também foram removidas assim como o ligante cristalizado, em seguida foi adicionado cargas de Kollman [42], por fim o arquivo foi salvo no formato .pdbqt, formato reconhecido pelo programa de docking do mesmo grupo.

4.3 DESENHO E OTIMIZAÇÃO DOS LIGANTES

Neste estudo foram usados 11 ligantes, sendo eles o lapachol e 10 derivados de lapachonas em seus isômeros alfa e beta.

Figura 12: Ligantes usados neste estudo.



Fonte: O autor.

Os 11 ligantes foram inicialmente desenhados no software MarvinSketch versão 20.18 [43], as estruturas orgânicas 2D foram exportadas no formato .mol e na sequência abertas no programa Avogadro versão 1.1.2 [44], no Avogadro as estruturas em 3D tiveram suas geometrias otimizadas por Mecânica Molecular com campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field 94*) [45], com 50 passos por atualização e algoritmo *Steepest Descent*. Ainda no Avogadro, foi gerado um arquivo de *input* para o programa MOPAC2016 [46] no formato .mop, o MOPAC2016 é um programa de química quântica computacional baseado em métodos semi-empíricos.

Para *input* no MOPAC2016 os parâmetros adicionados foram o método de otimização geométrica usando o PM7 (Parametric Method 7 Halmitonian) [47], além de *flags* GNORM=0.01, GRAPHF e PDBOUT, todos adicionados no arquivo de texto .mop. Os cálculos foram feitos no MOPAC2016 a partir do terminal do Linux e os resultados de

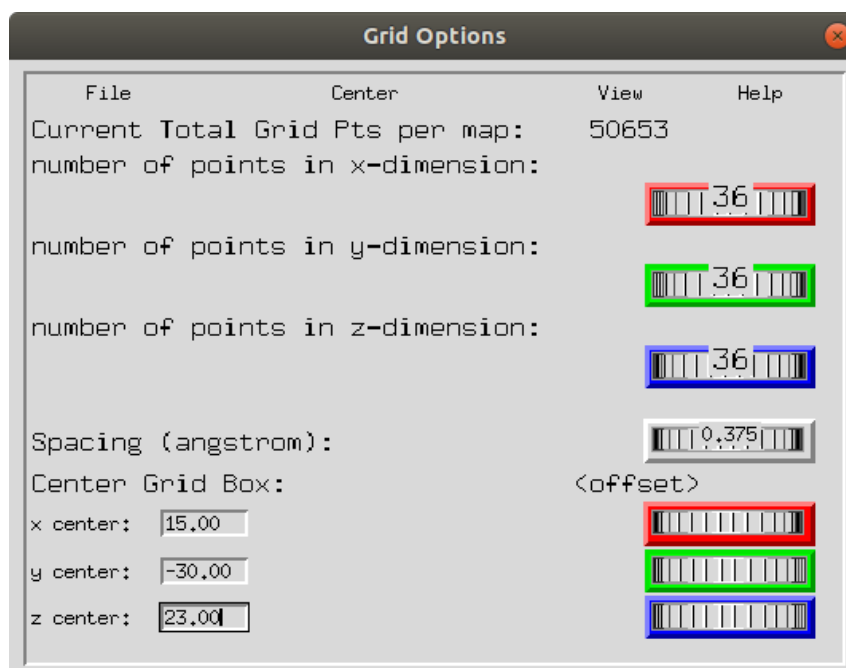
saída usados para coleta de informações geométricas, de energia e eletrônicas. Um dos arquivos de saída é a geometria otimizada no formato .pdb usados para o preparo dos ligantes para os cálculos de *docking* molecular.

O arquivo pdb obtido da otimização geométrica foi aberto no *input* de ligantes do programa AutoDockTools e foi adicionado cargas de Gasteiger [48], removidos os hidrogênios não polares e assinalado ligações rotacionáveis.

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOCKING

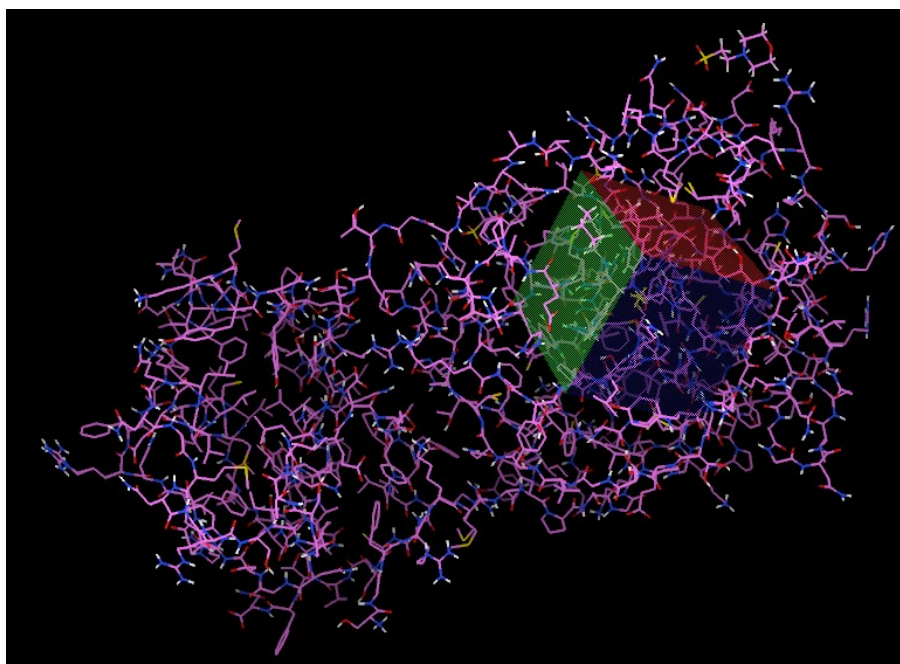
Antes de serem feitos os cálculos de ancoramento molecular com os ligantes otimizados, foi realizado o procedimento de *redocking*, onde o ligante X77 cristalizado com a proteína foi removido e realizado o *docking* junto a proteína. Os parâmetros de coordenadas de centro e o tamanho da caixa *grid box* (região no espaço onde o ligante é docado) estão explícitos nas figuras 13 e 14. Após a redocagem foi feito aliamento entre a estrutura do ligante X77 cristalizado com relação ao obtido pelo cálculo de docking e foi avaliado o valor de RMSD, bem como inspeção visual das estruturas tridimensionais de ambos, este processo foi feito no programa PyMOL v. 2.4.1 [49].

Figura 13: Parâmetros e valores necessários para o local de ancoramento na proteína.



Fonte: O autor, a partir do AutoDockTools v. 1.5.6.

Figura 14: Visão da *grid box* no sítio ativo da principal protease do SARS-CoV-2.



Fonte: O autor, a partir do AutoDockTools v. 1.5.6.

4.5 DOCKING MOLECULAR

A simulação computacional de *docking* foi realizada com o software AutoDock Vina versão 1.2.1, este programa é um dos mais amplamente utilizados para realização de *docking* molecular e *virtual screening*. Este software apresenta uma grande acurácia e rapidez na realização dos cálculos, pois apresenta implementado em seu código a capacidade de uso de *multithreading*, uso mais eficiente dos núcleos do processador e memória. O programa funciona com algoritmo *Iterated Local Search Global Optimizer* e desta forma faz uma busca estocástica global pelo mínimo de energia, além de parâmetros de mutação e otimização local com o método de busca *Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno*, obedecendo ao critério de Metrópolis [50]. O programa não apresenta interface gráfica e funciona diretamente no terminal do Linux, para isso é preciso utilizar um *input* em formato txt que será lido e processado pelo software, neste arquivo de configuração é necessário informar qual o receptor, o ligante e informações referentes de centro e tamanho da *grid box*.

Tabela 2: Parâmetros de configuração

Parâmetros	Valores
Nº de pontos em X	36
Nº de pontos em Y	36
Nº de pontos em Z	36
Espaçamento	0.375
Centro em X	15.00
Centro em Y	-30.00
Centro em Z	23.00
exhaustiveness	8
Nº de modos	1

Fonte: O autor.

Foi considerado apenas o primeiro modo de cada molécula, módulo de menor energia de afinidade. Os resultados foram obtidos e também utilizados para cálculo da constante de inibição teórica calculada cK_i , de acordo com a equação abaixo [51]:

$$K_i = \exp(\Delta G * 1000)/RT \quad (1.2)$$

onde ΔG é a energia de afinidade obtida do *docking*, R é a constante universal dos gases dada por $1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, T é a temperatura absoluta dada por 298.15 K e K_i é a constante de inibição em nM, para converter de nM para μM basta multiplicar o resultado por 1 000 000.

4.6 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES INTERMOLECULARES

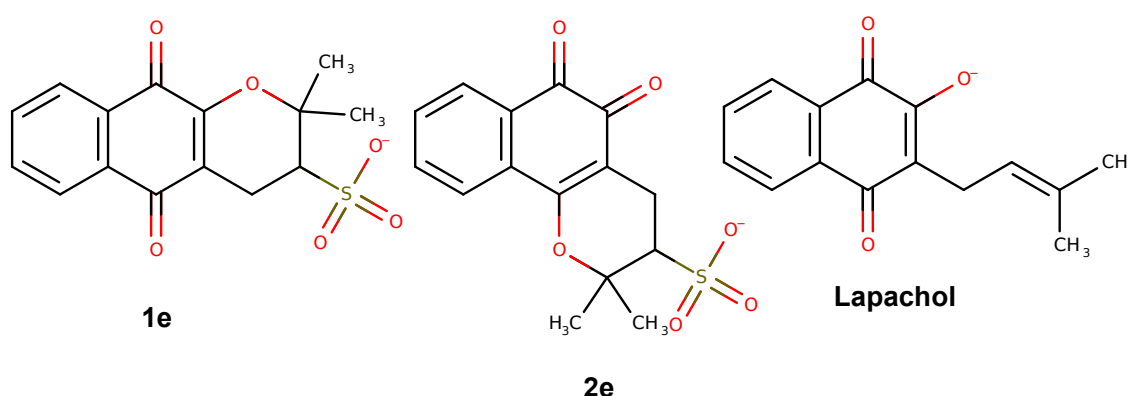
A análise das interações intermoleculares foram feitas por inspeção visual da estrutura tridimensional entre o ligante e a proteína e a medição das distâncias das interações com o software PyMOL. Também foram geradas imagens das interações em duas dimensões com mapas de interações obtidas através do programa LigPlot+ [52].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTRUTURAS OTIMIZADAS

Dentre as 11 estruturas estudadas, 3 apresentam em estado ionizado em pH fisiológico de 7,4, são elas as **1e**, **2e** e o **lapachol**. Sendo assim, essas estruturas foram utilizadas em seu estado ionizado nos cálculos de mecânica molecular, mecânica quântica por método semi-empírico e *docking*, para ter uma melhor aproximação de seu comportamento no organismo.

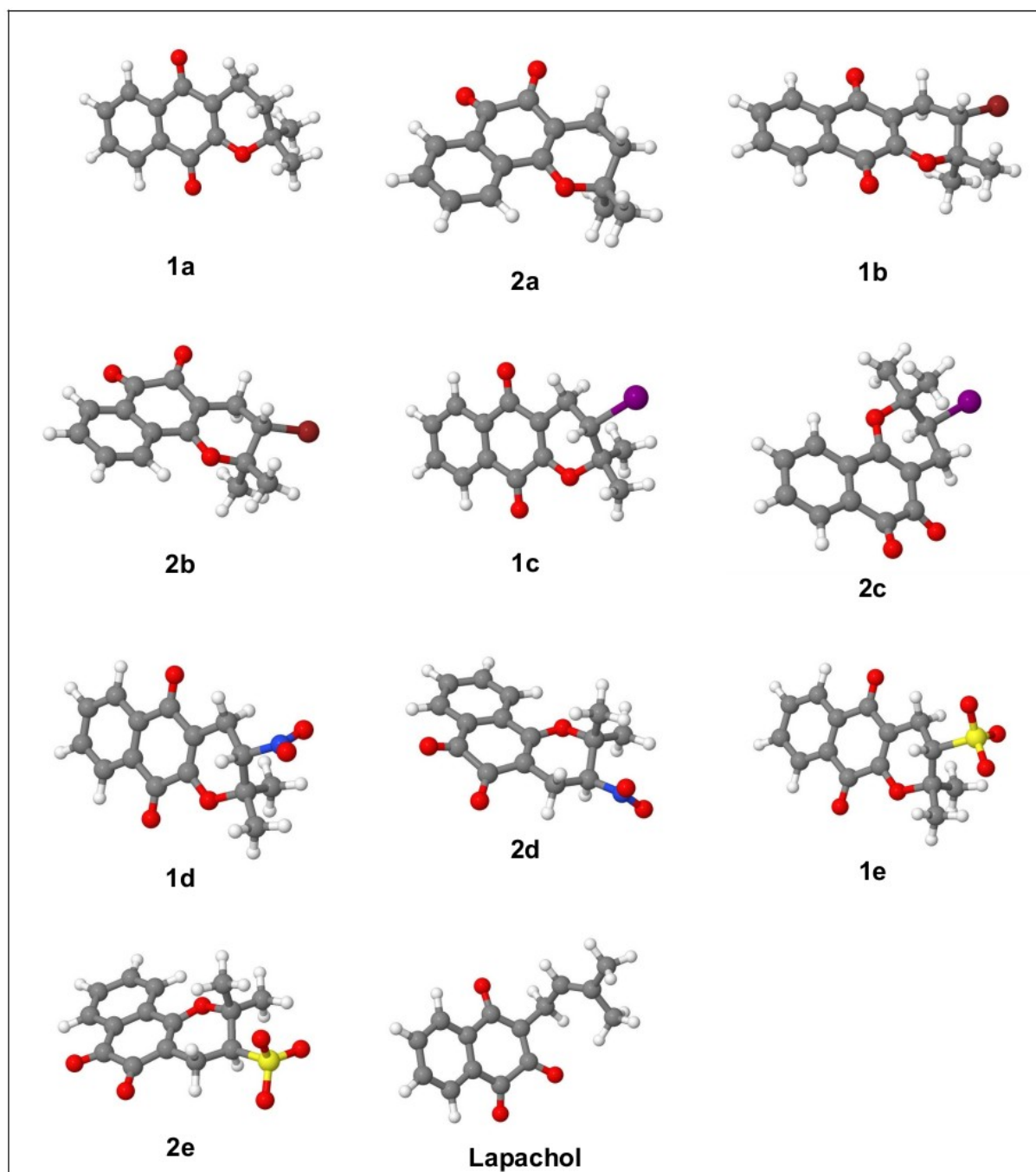
Figura 15: Estruturas ionizadas em pH fisiológico de 7,4.



Fonte: O autor, a partir do MarvinSketch

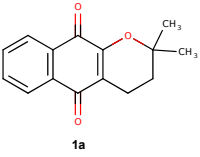
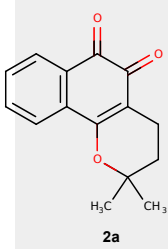
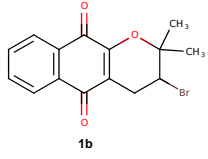
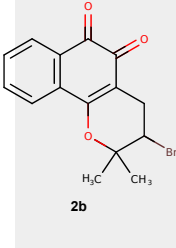
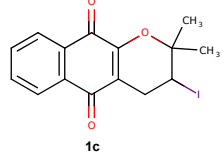
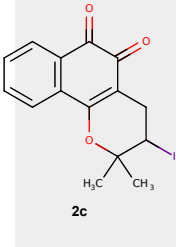
Os ligantes otimizados pelo MOPAC2016 estão representados pela **figura 16**, os métodos semi-empíricos são muito eficazes em otimizar moléculas orgânicas de tamanhos médio a grandes sistemas, como proteínas. Foi obtido parâmetros geométricos, como área e volume molecular, além de informações energéticas e de Orbitais Moleculares de Fronteira HOMO e LUMO na tabela 3. Tais parâmetros foram buscados tentando relacionar a estrutura com a atividade molecular.

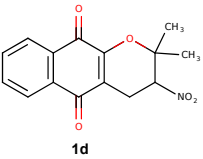
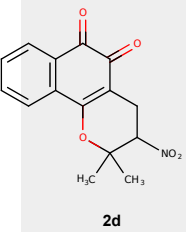
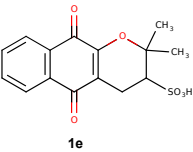
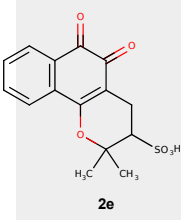
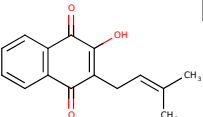
Figura 16: Estruturas dos ligantes otimizadas por PM7 no MOPAC2016.



Fonte: O autor.

Tabela 3: Propriedades obtidas a partir de cálculo semi-empírico com PM7.

Estrutura	Ligantes	ΔH_f kcal.mol ⁻¹	E_{total} eV	Dipolo D	E_{HOMO} eV	E_{LUMO} eV	Área Å ²
	1a	-85,528	-2917,095	1,094	-9,420	-1,445	256,19
	2a	-84,519	-2917,036	6,252	-9,224	-1,363	255,45
	1b	-80,587	-3125,974	1,883	-9,735	-1,631	273,83
	2b	-79,633	-3125,916	6,221	-9,498	-1,555	272,60
	1c	-67,427	-3126,884	2,143	-9,167	-1,616	280,51
	2c	-66,441	-3126,825	6,306	-9,215	-1,539	279,39

	1d	-87,137	-3677,383	4,134	-10,038	-1,833	277,86
	2d	-86,134	-3677,324	6,915	-9,742	-1,758	276,11
	1e	-251,057	-3968,438	16,370	-6,161	0,791	291,07
	2e	-250,867	-3968,413	16,500	-6,212	0,842	288,73
	Lapachol	-124,427	-2905,462	4,762	-4,503	2,432	263,80

Fonte: O autor.

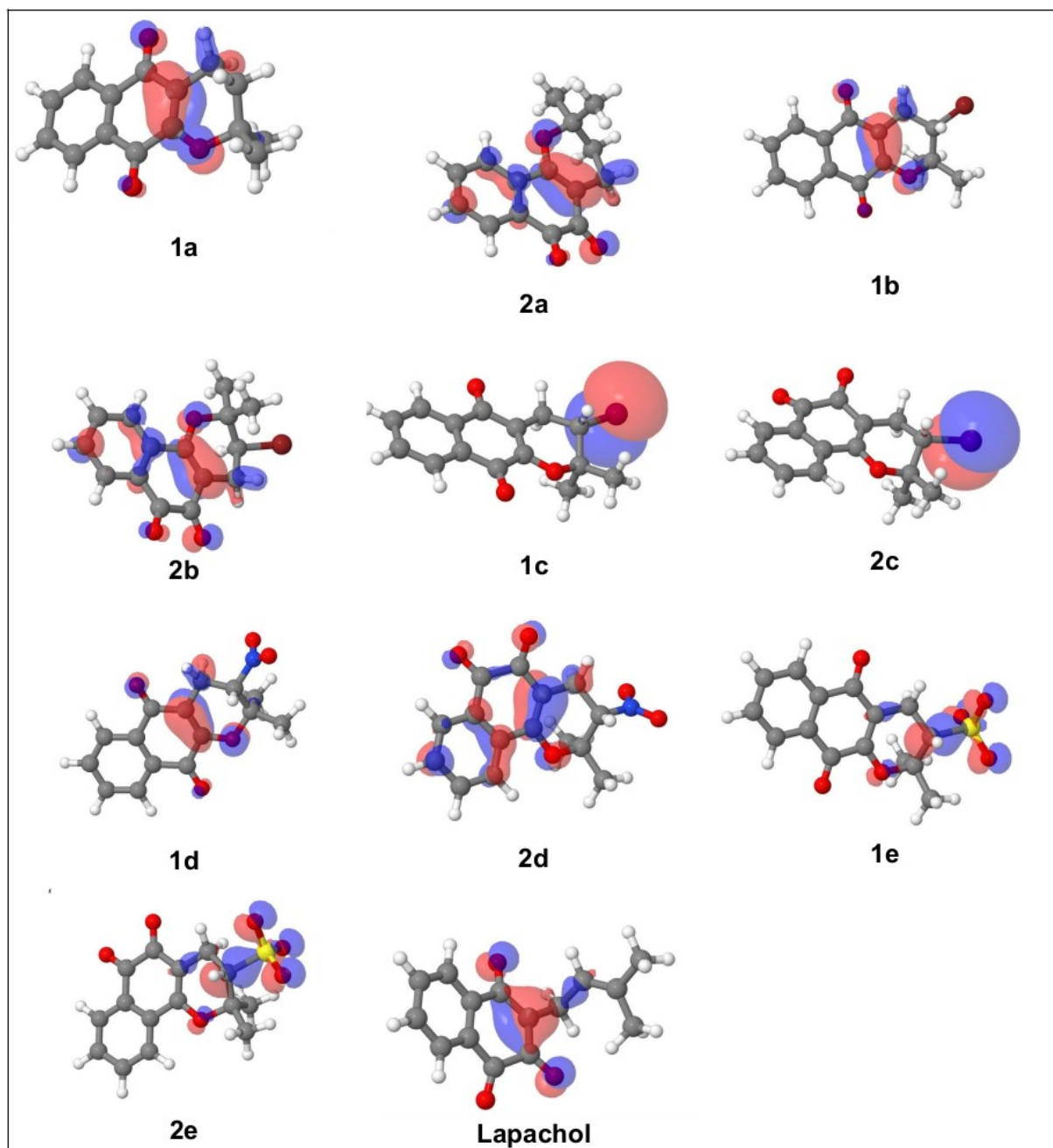
De acordo com os dados obtidos e exibidos na Tabela 3, é possível afirmar *a priori* que os isômeros α -lapachona e seus derivados apresentam menor energia de formação e energia total, o que pode indicar que tais moléculas são mais estáveis do que seus respectivos isômeros β . Dentre as de menor energia temos os ligantes **1e**, **2e** e o **Lapachol**, respectivamente, estes no pH fisiológico apresentam em seus estados ionizados e sendo assim apresentam carga negativa.

Os ligantes de maior energia são os **2c**, **1c** e **2b**, o que pode indicar que tais moléculas sejam mais instáveis do que as demais. Os parâmetros de área e volume são importantes no estudo de *docking* molecular, pois na relação do ligante com o sítio de

ligação de um receptor as moléculas interagem por interações eletrostáticas, de interações não ligadas, os fatores estéricos também influenciam. Uma molécula muito grande pode não adentrar num determinado sítio e fazer as interações necessárias para obtenção da atividade biológica, moléculas pequenas demais podem não ter os grupos farmacofóricos nas distâncias necessárias para uma adequada complementaridade.

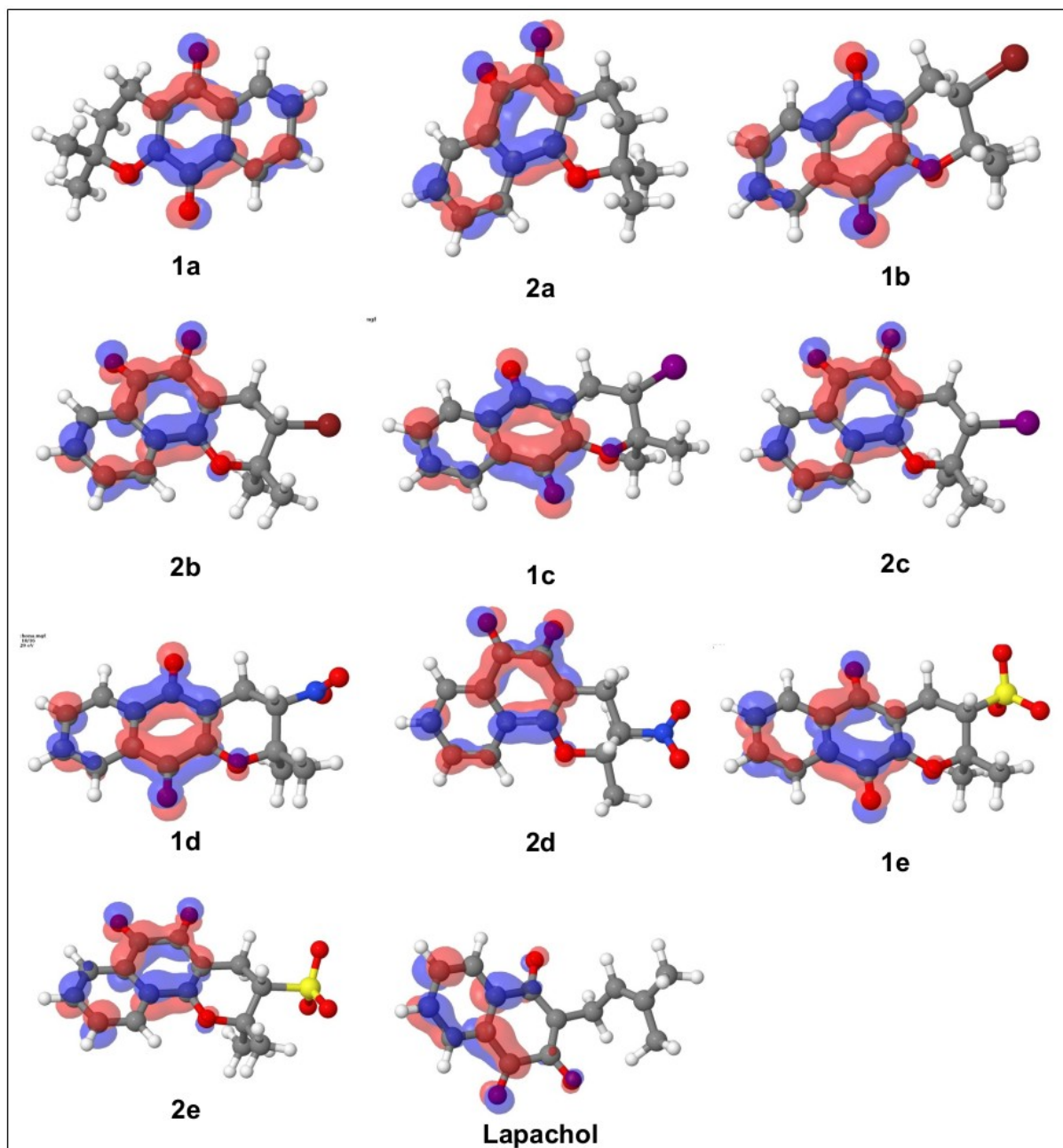
A teoria dos orbitais moleculares nos ajuda a entender melhor sobre propriedades das moléculas, como dureza e reatividade. Altas diferenças entre os orbitais de fronteira HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) indicam que são moléculas duras, enquanto menores diferenças de energia entre estes orbitais indicam espécies moles, de acordo com a teoria de Pearson. Quanto maior a diferença também indicam espécies químicas mais estáveis e menos reativas, enquanto menores valores HOMO-LUMO indica que a espécie química em questão é mais reativa [53].

Figura 17: Estruturas dos ligantes evidenciando os orbitais HOMO.



Fonte: O autor.

Figura 18: Estrutura dos ligantes evidenciando os orbitais LUMO.

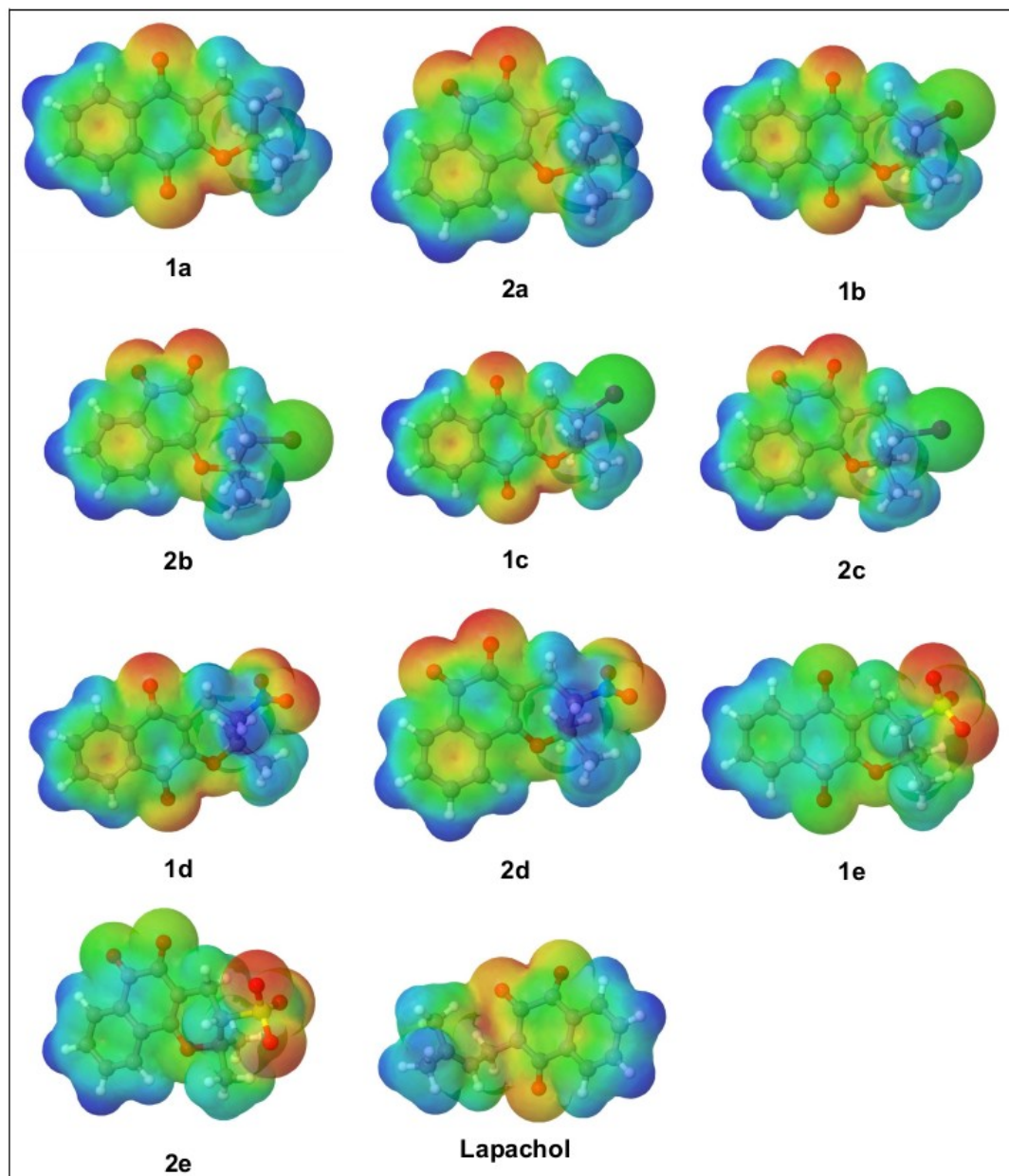


Fonte: O autor.

As propriedades eletrostáticas dos ligantes são de grande interesse, pois reconhecendo as regiões da molécula com propriedades de maior ou menor densidade de carga é possível antecipar grupos de maior ou menor densidade eletrônica e que poderá interagir com o sítio receptor com interações atrativas e repulsivas dependendo das características dos resíduos de aminoácidos. A Figura 19 mostra as superfícies de potencial eletrostático dos 11 ligantes, onde a cor que tende para o vermelho apresenta

maior densidade de carga, enquanto a cor deslocada para o azul regiões de baixa densidade de carga.

Figura 19: Superfície de potencial eletrostático dos ligantes.



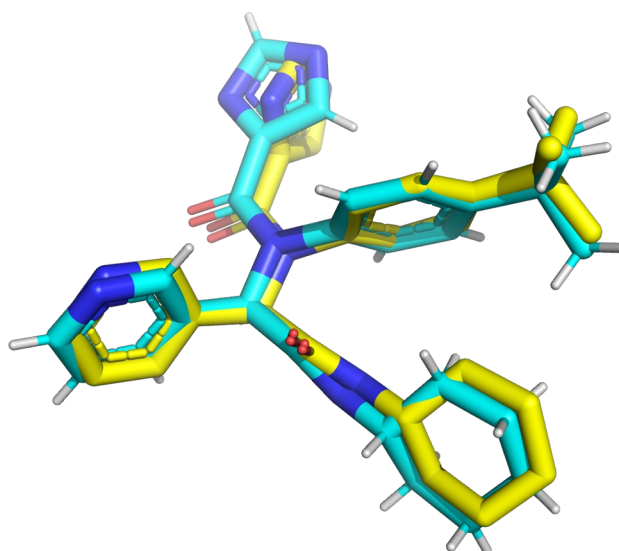
Fonte: O autor.

Na Figura 19 as regiões em azul tem maior potencial de realizar interações hidrofóbicas, enquanto as regiões em vermelho tem maior potencial como aceptores de ligações de hidrogênio. Os anéis benzênicos apresentam maior densidade de carga no centro do anel e menor densidade nas extremidades, estas regiões podem participar de interações como as pi-pi com o sítio ativo do receptor.

5.2 ANÁLISE DO *REDOCKING*

O procedimento de redocking do ligante co-cristalizado X77 com a enzima do vírus SARS-CoV-2 PDB ID 6W79, feito com os procedimentos e parâmetros descritos no item 4.4 da metodologia, obteve resultados satisfatórios, onde $\text{RMSD} \leq 2,0\text{\AA}$ valida a metodologia empregada no *docking* [54]. A sobreposição da estrutura cristalográfica e da obtida pelo cálculo de *docking* resultou em RMSD de 0,856 Å e energia de ligação -9,0 kcal.mol⁻¹. A Figura 20 mostra a sobreposição das estruturas.

Figura 20: Sobreposição do ligante X77 co-cristalizado em azul e o ligante obtido por docking em amarelo, RMSD=0,856Å.



Fonte: O autor.

Tais resultados do *redocking* validaram a metodologia e o software na capacidade de predição e acurácia da conformação próxima a obtida experimentalmente por difração de Raios-X. Desta forma o mesmo método foi usado para cálculo de *docking* com os 11 ligantes deste trabalho.

5.3 ANÁLISE DO DOCKING E INTERAÇÕES INTERMOLECULARES

Neste estudo foram obtidas 11 conformações, 1 conformação ou pose para cada um dos ligantes, sendo esta a conformação de menor energia de ligação entre o ligante e a enzima, classificado de acordo com a função de pontuação implementada no Autodock Vina. Os resultados de energia de ligação e constante de inibição calculada estão listados na tabela 4.

Tabela 4: Energia de ligação e constante de inibição teórica para os 11 ligantes naftoquinônicos.

Ligantes	Energia de afinidade (kcal.mol ⁻¹)	Constante de Inibição Ki (µM)
Lapachol	-7,1	6,24
1a	-7,5	3,18
2a	-7,0	7,39
1b	-7,7	2,27
2b	-7,4	3,76
1c	-7,7	2,27
2c	-7,5	3,18
1d	-7,9	1,62
2d	-7,8	1,91
1e	-8,1	1,15
2e	-8,5	0,59

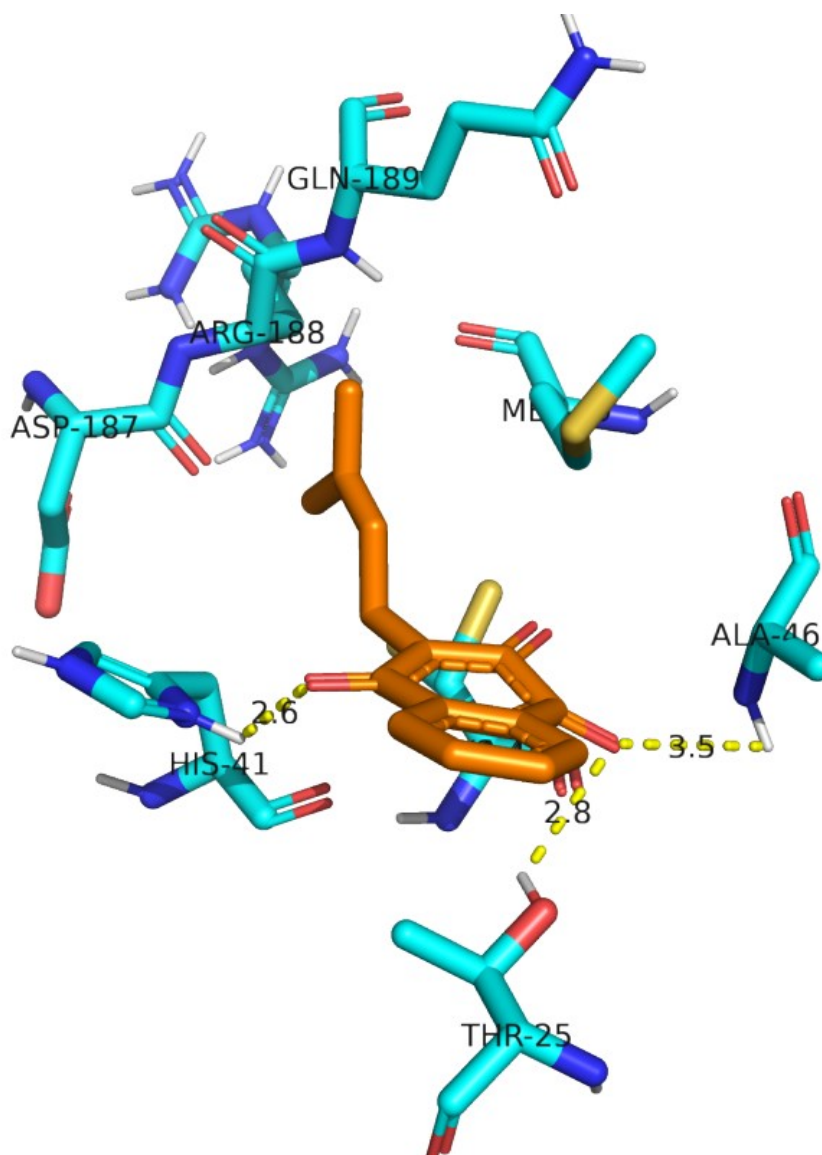
Fonte: O autor.

O lapachol é usado como precursor para a síntese dos demais ligantes usados neste estudo, por isso, o lapachol também foi incluído para fins de comparação. Em comparação com os demais o lapachol apresentou valor próximo de energia livre de ligação com a enzima e valor 0,1 kcal.mol⁻¹ menor do que o composto **2a**. O lapachol apresentou ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos His41, Ala46 e Thr25, sendo que neste caso o lapachol atuou apenas como receptor das ligações de hidrogênio através dos oxigênios das carbonilas, as interações e comprimentos de ligações podem ser visualizados na figura 21.

Na figura 21 é possível observar uma ligação de hidrogênio de 2,6 Å com a Histidina-41, 2,8 Å com a Treonina-25 e 3,5 Å com a Alanina-46. Tais interações somadas as interações hidrofóbicas evidenciam a estabilidade da interação entre o ligante e a enzima, obtendo um ΔG_{lig} satisfatório. Um fato importante para ser destacado é a ligação de

hidrogênio envolvendo a His-41, por se tratar de um resíduo essencial para atividade catalítica da enzima, desta forma o lapachol se mostra um potencial inibidor.

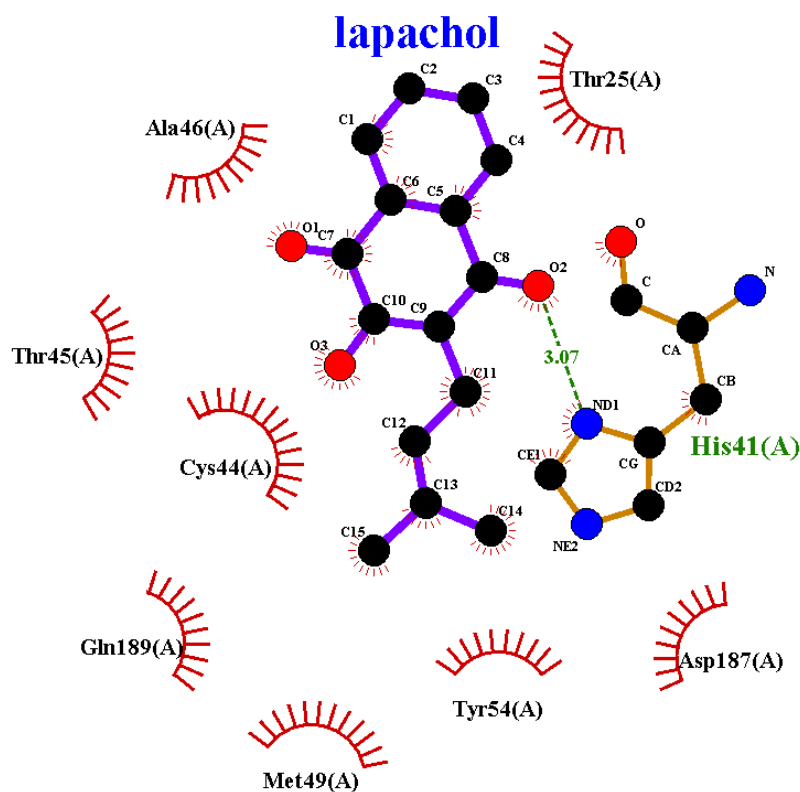
Figura 21: Interações entre o lapachol e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da M^{pro} do SARS-CoV-2.



Fonte: O autor.

Outra forma de visualizar as interações entre o ligante e a enzima é através de diagrama em duas dimensões obtidas através do LigPlot+, na figura 22 é possível observar as interações hidrofóbicas e a ligações de hidrogênio.

Figura 22: Diagrama 2D obtido com o software LigPlot+ de interações do lapachol com o sítio ativo da M^{pro} do SARS-CoV-2.

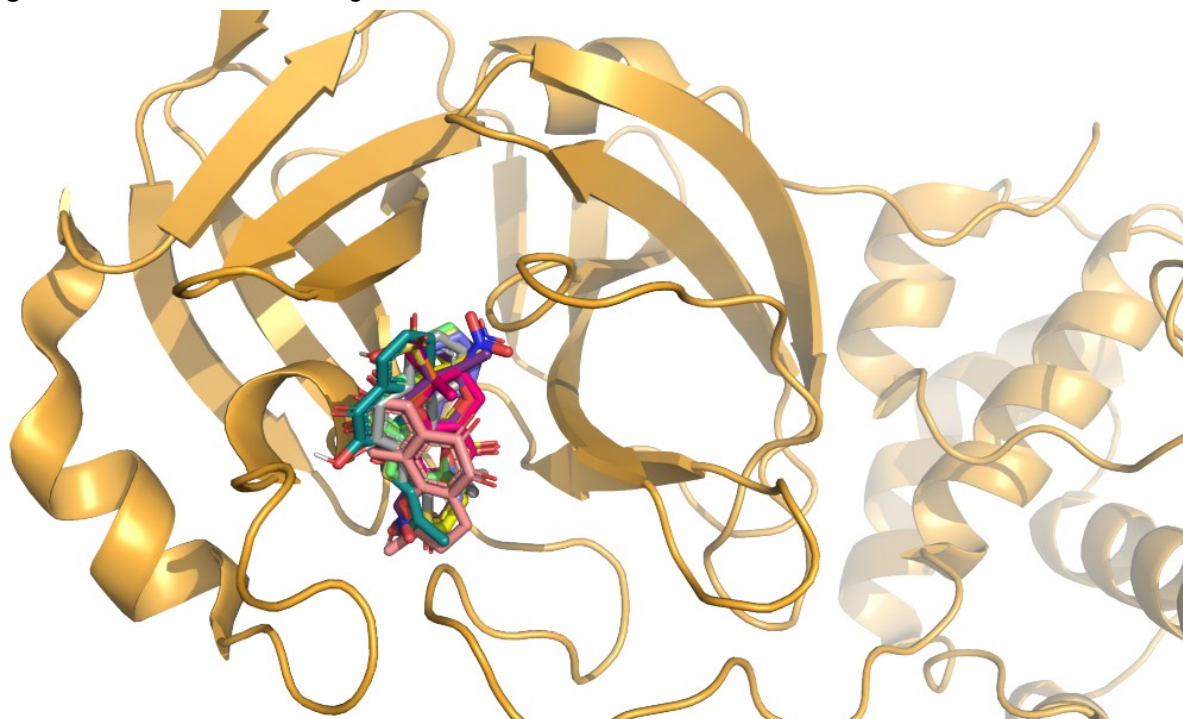


Fonte: O autor.

Como é possível notar o LigPlot+ calculou de forma diferente e obteve comprimento de ligação diferente do obtido em 3D a partir do PyMOL, por isso é sempre importante fazer uma inspeção visual de forma tridimensional.

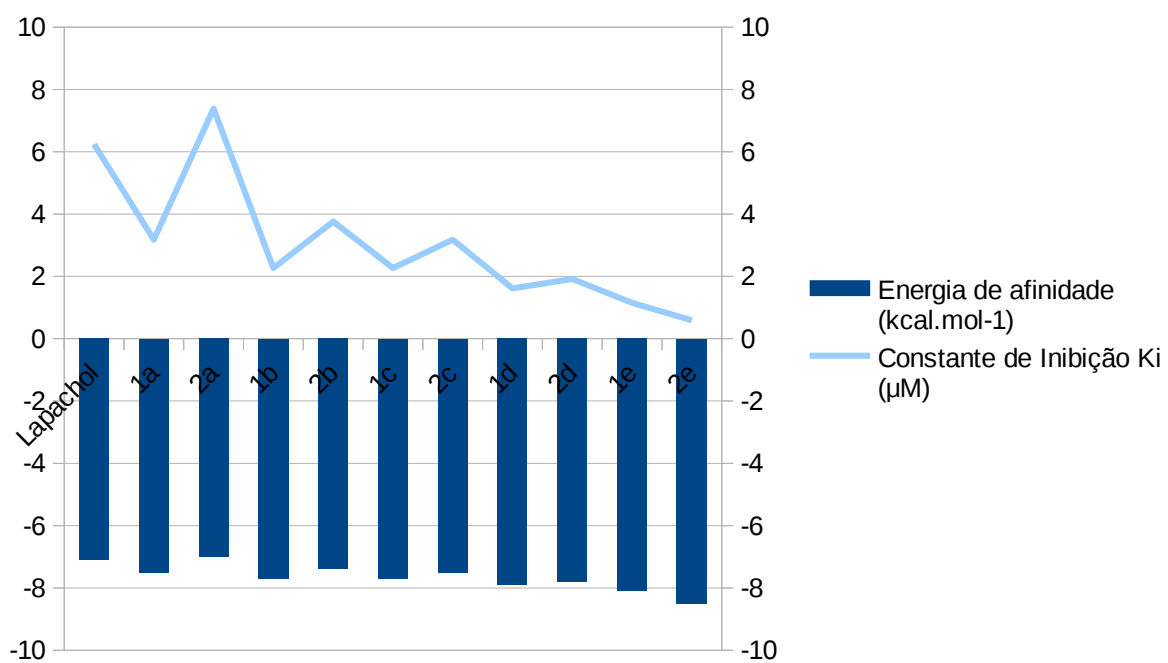
O resultado do *docking* dos demais ligantes convergiram de forma que todos ligaram-se ao sítio ativo da enzima no mesmo local, como é mostrado na figura 23. Os derivados sulfonados tiveram as melhores energias de afinidade, sendo o **1e** com $-8,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o **2e** com $-8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Em seguida, os compostos nitrados apresentaram melhores energias, sendo o **1d** com $-7,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e o composto **2d** com $-7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Figura 23: União de todos os ligantes no sítio ativo da M^{pro} do SARS-CoV-2.



Fonte: O autor.

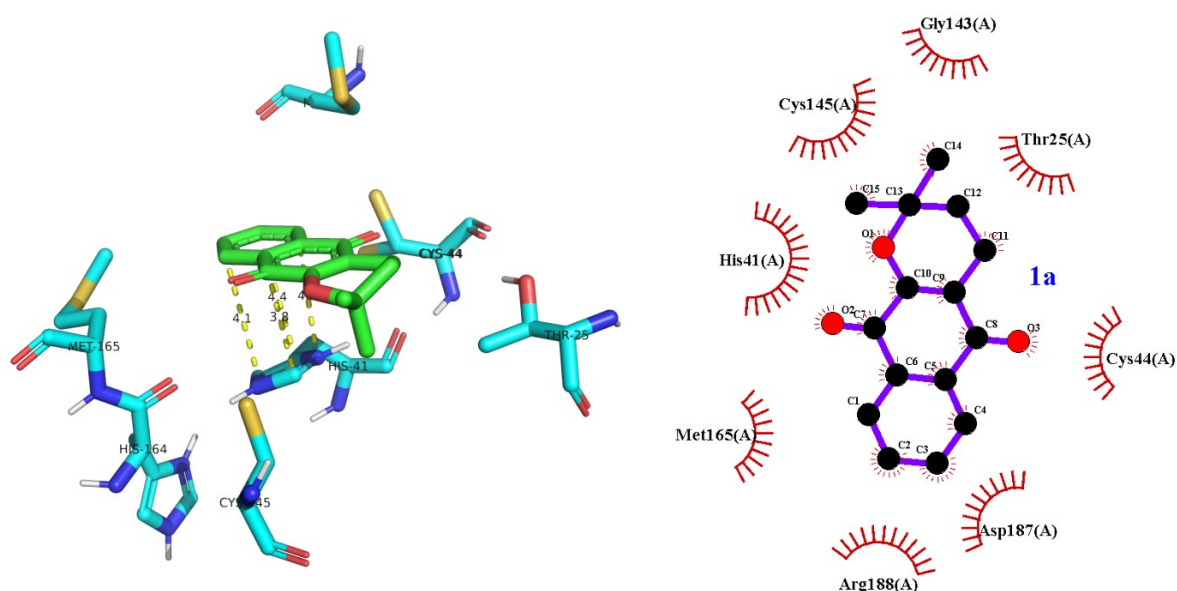
Figura 24: Gráfico que relaciona as energias de afinidade e constante de inibição teórica dos 11 ligantes estudados.



Fonte: O autor.

A figura 24 mostra que as energias de afinidade não tiveram uma grande variação, por outro lado, a constante de inibição evidencia que mesmo pequenas diferenças nas energias de afinidade geram uma diferença significativa em suas constantes de inibição. A constante de inibição calculada não reflete os seus valores reais experimentais, porém serve de parâmetro para ter noção do padrão de inibição real, quanto menor a constante de inibição melhor será a capacidade do ligante se fixar e inibir a capacidade catalítica que a enzima realiza. Para o desenvolvimento de moléculas bioativas que tem como alvos enzimas é desejável que possua estas características.

Figura 25: Interações 3D e diagrama 2D do composto **1a** (α -lapachona) com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2.

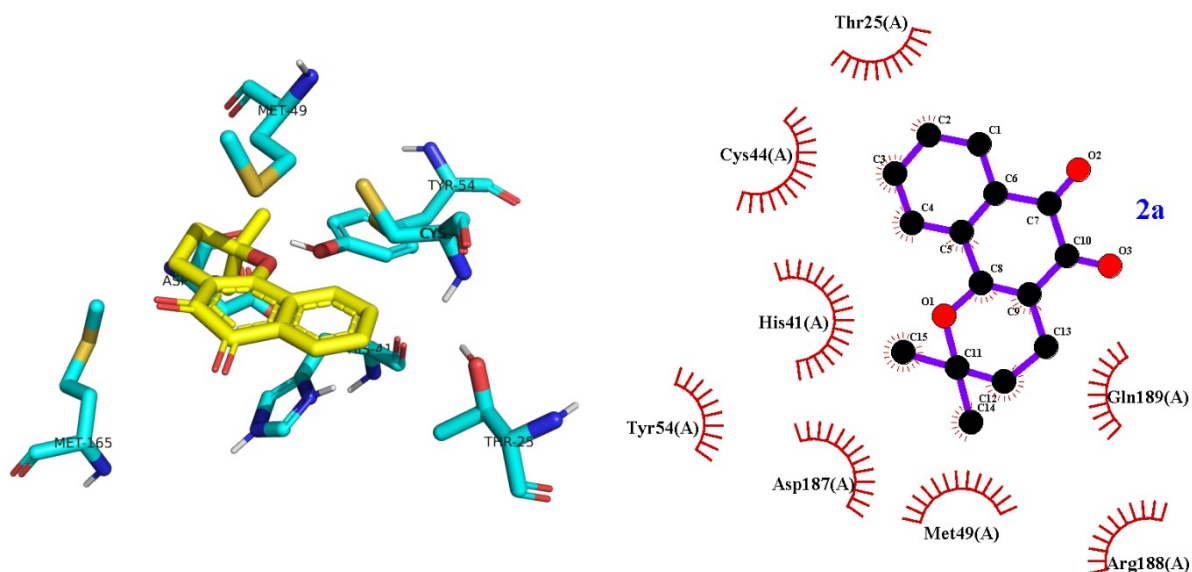


Fonte: O autor.

As interações do ligante **1a** (α -lapachona) são do tipo hidrofóbicas, a parte tridimensional da figura 25 ainda mostra interações do tipo empilhamento π - π entre o anel benzênico do ligante e imidazol do resíduo da Histidina-41. A composição das interações ajudam a estabilizar o ligante no sítio ativo.

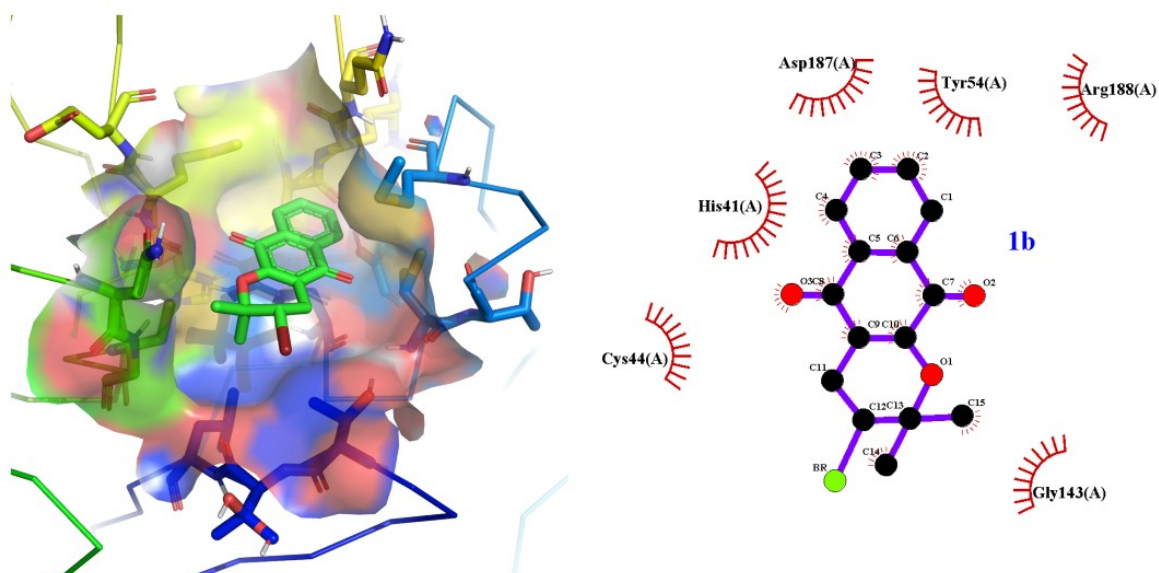
A β -lapachona é o isômero da α -lapachona, neste estudo identificada como **2a**, em comparação ao seu isômero a **2a** obteve também interações hidrofóbicas, mas sem interações do tipo π - π e com isso apresentou energia de afinidade maior do que **1a**, $-7,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Figura 26: Interações 3D e diagrama 2D do composto **2a** (β -lapachona) com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2.



Fonte: O autor.

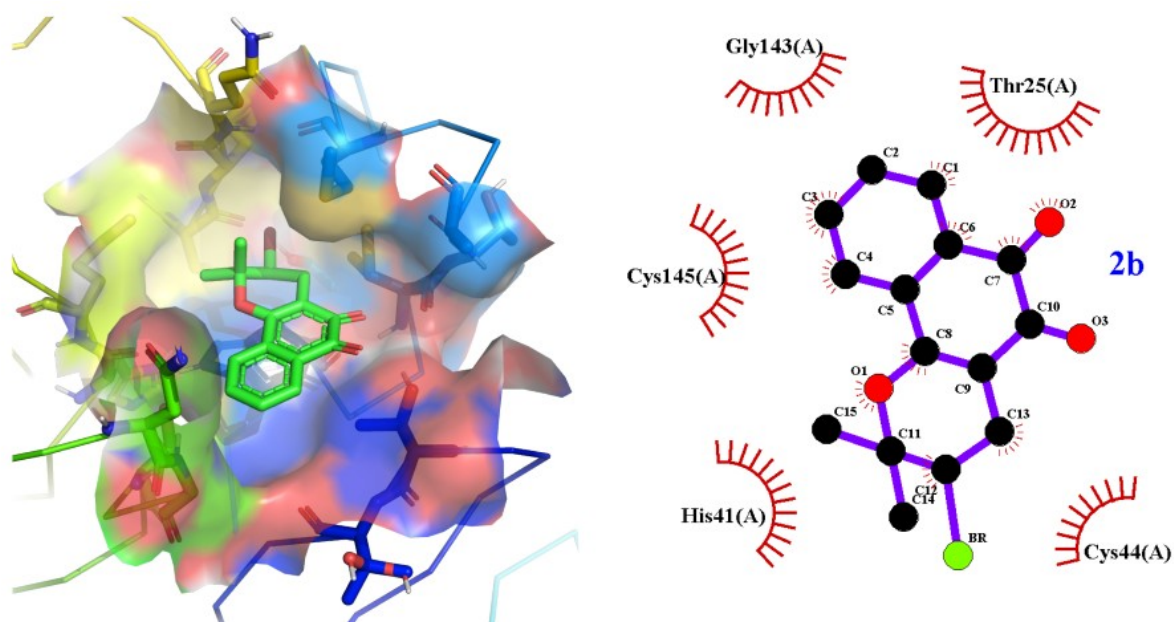
Figura 27: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **1b** com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2.



Fonte: O autor.

Mesmo apresentando interações puramente hidrofóbicas a adição de bromo melhorou a energia de afinidade de $-7,5$ para $-7,7$ kcal.mol⁻¹.

Figura 28: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **2b** com os resíduos dos aminoácidos da M^{PRO} do SARS-CoV-2.

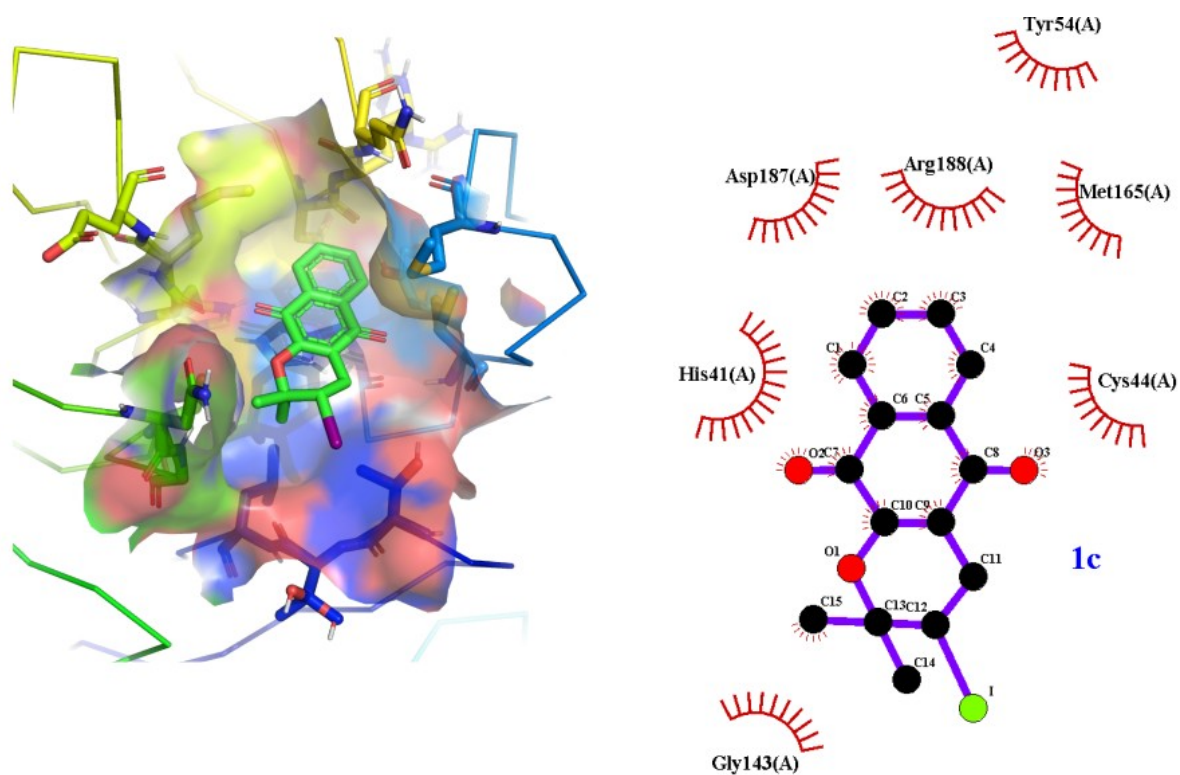


Fonte: O autor.

Como o padrão de atividade dos isômeros beta, o composto **1b** apresentou melhor afinidade pela enzima do que o isômero **2b**. As interações que ocorrem são devido a somatória de interações de caráter hidrofóbico, pois não apresentam ligações de caráter polar, como as interações de hidrogênio.

O ligante **1c** que possui um iodo em sua estrutura apresentou características semelhantes ao **1b** que também possui um halogênio em sua estrutura que é o bromo, ambos apresentaram energia de afinidade $-7,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

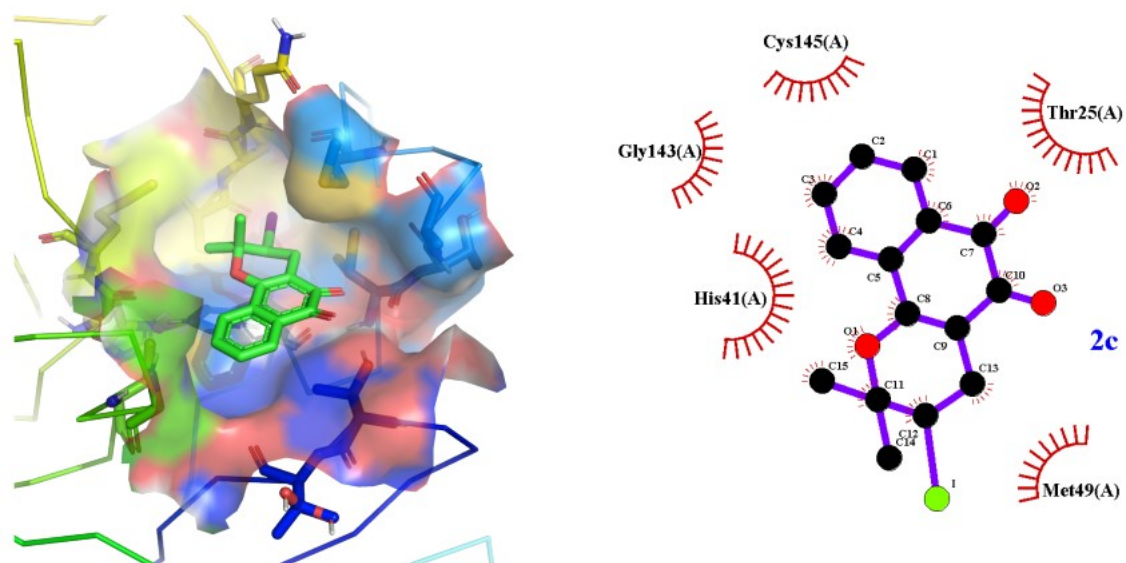
Figura 29: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **1c** com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2.



Fonte: O autor.

Seguindo a tendência, o ligante **2c** obteve menor afinidade pela enzima em comparação ao seu isômero **1c**.

Figura 30: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **2c** com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2.



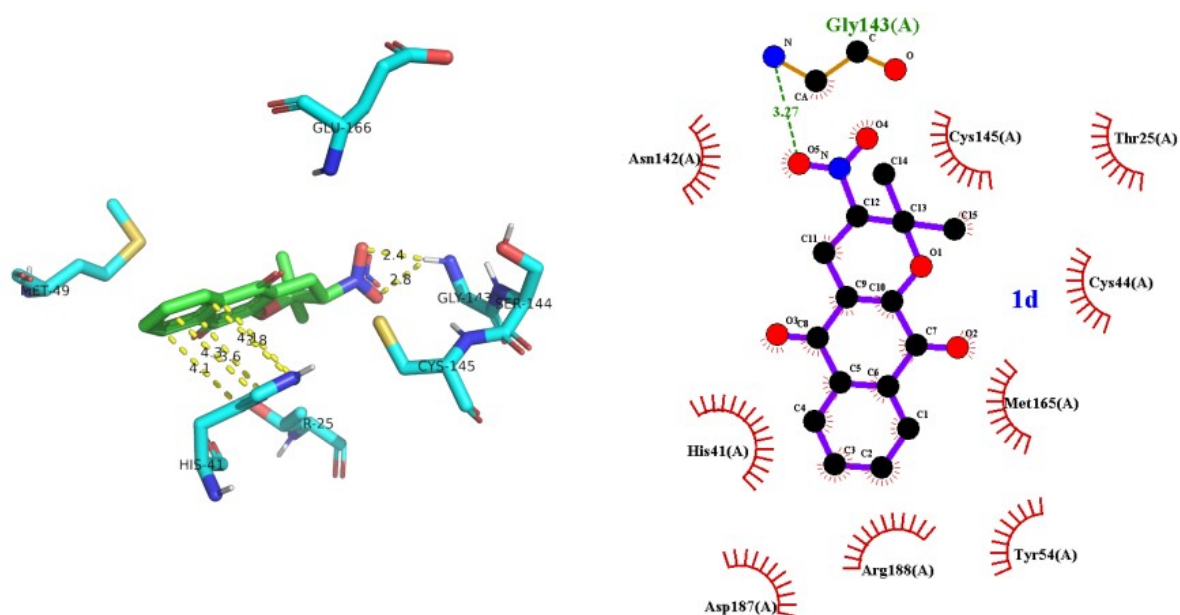
Fonte: O autor.

Os compostos **1d**, **2d**, **1e** e **2e** tiveram as melhores energias de afinidade dentre os 11 ligantes estudados, o que pode sugerir que os grupos nitro e ácido sulfônico são grupos importantes para ter uma melhor atividade. Este fato é mostrado também pelas interações que os ligantes fazem com o sítio ativo da enzima do SARS-CoV-2, serão apresentadas imagens das interações analisadas nas imagens seguintes.

Estudo semelhante de *Virtual Screening* com os fármacos usados no tratamento da COVID-19 como a hidroxicloroquina e azitromicina obteve resultados inferiores aos obtidos neste estudo, sendo o melhor resultado $-6,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a ruxolitinibe e pior $-5,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para a hidroxicloroquina [4]. O que mostra o potencial dos derivados naftoquinônicos como possíveis inibidores da M^{pro} , bem como a investigação de inúmeras outras quinonas naturais e sintéticas.

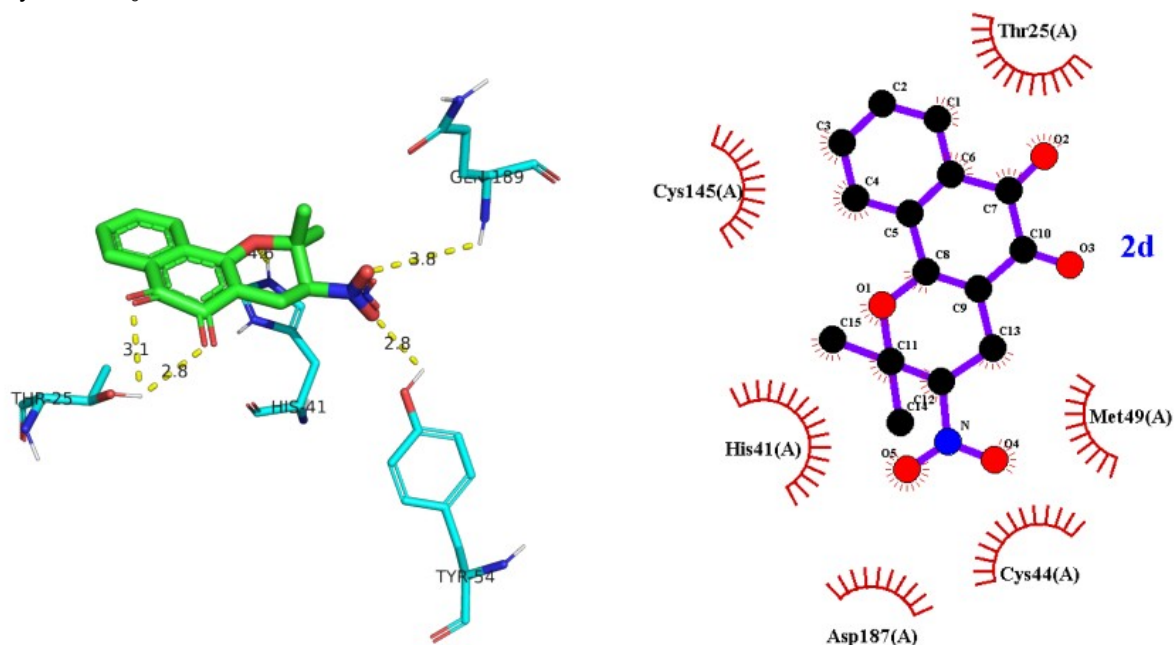
Dos 11 ligantes, 5 são derivados da α -lapachona e 5 são derivadas da β -lapachona e o lapachol. As cinco moléculas derivadas da α -lapachona identificadas neste estudo como **1a**, **1b**, **1c**, **1d** e **1e** foram as que apresentaram menores energia de formação, energia total, energia HOMO e LUMO e também momentos de dipolo, obtidos a partir de cálculos semi-empíricos usando método PM7, representados na tabela 3. Além destas propriedades, os mesmos compostos também apresentaram menores energia de afinidade (ΔG_{lig}) o que os torna também melhores inibidores por ter menor energia para ligar-se à enzima. Todos os 11 compostos apresentaram boa complementariedade estérica no sítio ativo, sendo os os ligantes **2a**, **2b**, **2c**, **2d** e **2e** tiveram um maior volume molecular.

Figura 31: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **1d** com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2, tracejado amarelo no anel representam interações do tipo π -stacking e os oxigênios do grupo nitrato fazendo ligação de hidrogênio com o resíduo Gly143, $\Delta G_{lig} = -7,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$.



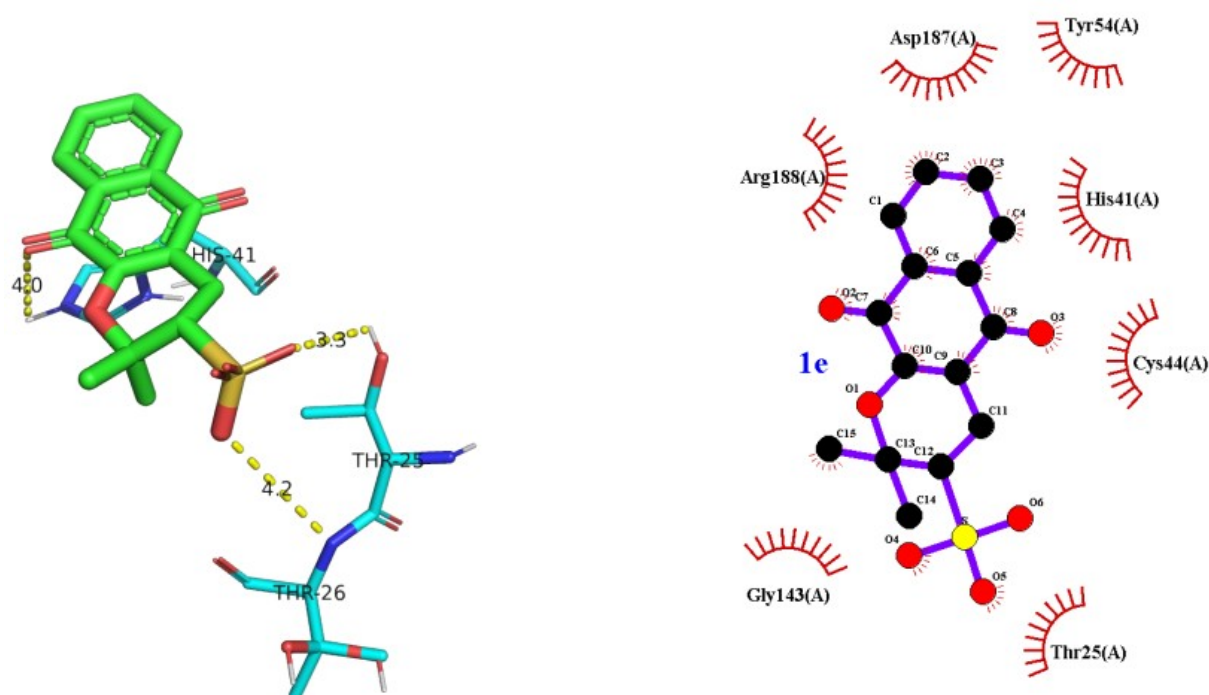
Fonte: O autor.

Figura 32: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **2d** com os resíduos dos aminoácidos da M^{pro} do SARS-CoV-2, tracejados amarelos representando ligações de hidrogênio com a Thr25, His41, Gly189 e Tyr54, $\Delta G_{lig} = -7,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$.



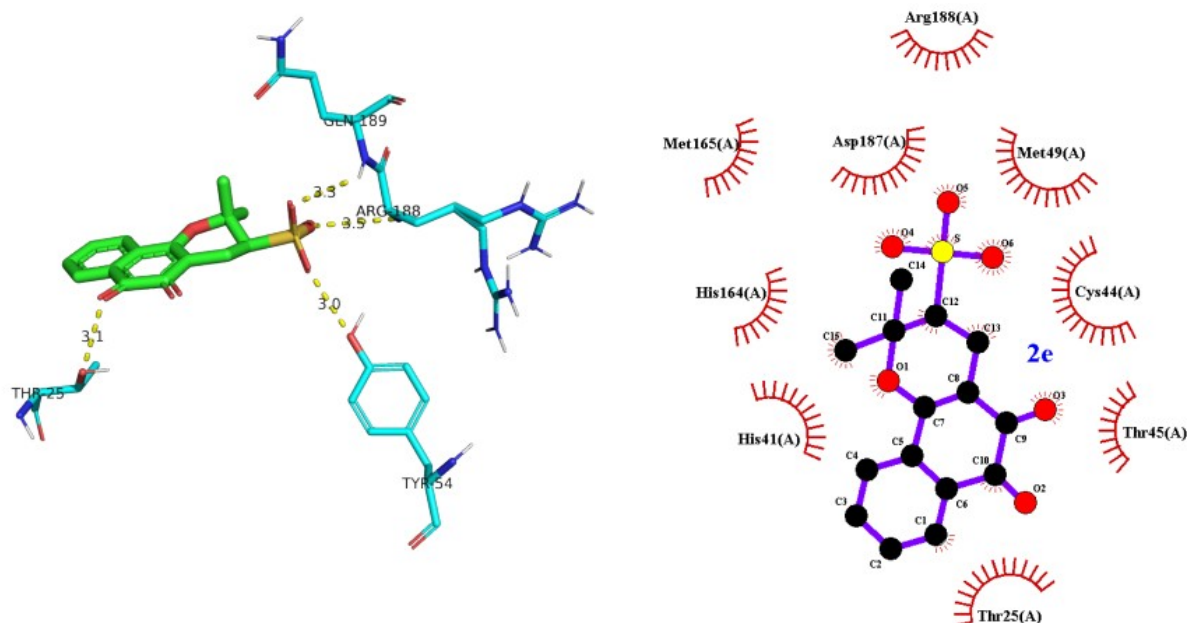
Fonte: O autor.

Figura 33: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **1e** com os resíduos dos aminoácidos da Mpro do SARS-CoV-2, tracejados mostrando ligações de hidrogênio com a Tyr25, His41, Tyr54 e Gly189, $\Delta G_{lig} = -8,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$.



Fonte: O autor.

Figura 34: Interações 3D e diagrama 2D do ligante **2e** com os resíduos dos aminoácidos da Mpro do SARS-CoV-2, tracejados amarelos representam ligações de hidrogênio com Thr25, Tyr54, Arg188 e Gly189, $\Delta G_{lig} = -8,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$.



Fonte: O autor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do presente estudo é possível concluir que as naftoquinonas são potenciais inibidores para a principal protease do vírus SARS-CoV-2.

As 11 moléculas apresentaram bons resultados quanto a sua energia de afinidade frente a enzima, usando a técnica de docking molecular. Além do fato de apresentarem resultados promissores em comparação aos da literatura usando os principais medicamentos do tratamento da COVID-19 como hidroxicloroquina e azitromicina.

Com relação a comparação de afinidade entre os isômeros derivados da α -lapachona e os derivados da β -lapachona, os derivados da α -lapachona apresentaram as melhores energias de afinidade e conseqüentemente melhor potencial de inibição.

O lapachol é um reagente de partida para a síntese dos demais compostos e o lapachol em si apresentou resultados promissores, obtendo energia de afinidade inferior ao composto **2a** (beta-lapachona).

Das propriedades moleculares, os derivados da α -lapachona apresentaram menores energias de formação e total, o que pode sugerir que tais compostos são mais estáveis que seus respectivos isômeros beta.

Os derivados da β -lapachona possuem volumes moleculares ligeiramente maiores, o que junto ao fato da conformação de suas carbonilas estarem próximas diminuir suas possibilidades de ligações de hidrogênio. Fora o fato de serem termodinamicamente menos estáveis do que os seus isômeros α . Estes fatores parecem contribuir para terem menor afinidade.

Os melhores ligantes foram os **1d** e **2d** que apresentam o grupo nitro e os **1e** e **2e** que apresentam o grupo ácido sulfônico. Tais grupos possibilitam ligações de hidrogênio favoráveis, além de menores energia de formação e totais.

Um estudo mais detalhado usando dinâmica molecular e métodos mais robustos de otimização das moléculas e cálculos de propriedades moleculares poderão fornecer informações ainda melhores a respeito das moléculas e da interação com o sítio ativo. Outro método adicional seria considerar a proteína flexível, ou pelo menos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da M^{pro}.

Avaliações *in vitro* e *in vivo* poderão testar a validade experimental deste trabalho de modelagem molecular.

REFERÊNCIAS

- [1] FERRARI, F. COVID-19: Dados Atualizados e sua Relação Com o Sistema Cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo , v. 114, n. 5, p. 823-826, 2020 .
- [2] ESAKANDARI, H., et al. A comprehensive review of COVID-19 characteristics. **Biological Procedures Online**, v. 22, p. 1-10, 2020.
- [3] WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020. Disponível em <https://covid19.who.int/>, acessado em setembro de 2020.
- [4] MARINHO, E. M.; ANDRADE-NETO, J. B.; SILVA, J.; SILVA, C. R.; CAVALCANTI, B. C.; MARINHO, E. S.; NOBRE-JUNIOR, V. N. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**. v. 148, p. 104365, 2020.
- [5] SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. de. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, São Paulo ,v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.
- [6] HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD V.U.; MIANA, G.A.; GREEN, I.R. Lapachol: An Overview. **Arkivoc**, 2007, 145.
- [7] FERREIRA, S.B., GONZAGA, D.T.G., SANTOS, W.C., ARAÚJO, K.G.L., FERREIRA, V.F. β -Lapachona: Sua Importância em química medicinal e modificações estruturais, **Rev. Virtual Quím.**v.2, n.2, 140-160, 2010
- [8] CUNHA, A.S.; LIMA, E.S.; PINTO, A.C.; ESTEVES-SOUZA, A.; ECHEVARRIA, A.; CAMARA, C.A.; VARGAS, M.D.; TORRES, J.C. Synthesis of Novel Naphthoquinone-Spermidine Conjugates and Their Effects on DNA Topoisomerases I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2006, 17, 439.
- [9] DE OLIVEIRA, R. N.; DA SILVA, M. G.; DA SILVA, M. TARGINO; et al. New Strategies for Molecular Diversification of 2-[Aminoalkyl-(1H-1,2,3-triazol-1yl)]-1,4-naphthoquinones Using Click Chemistry, **J. Braz. Chem. Soc.** 2017, 28, 681-688.

- [10] NETTO-FERREIRA, J. C.; LHIAUBET-VALLET, V; DA SILVA, A. R.; DA SILVA, A. M.; FERREIRA, A. B. B.; MIRANDA, M. A. The photochemical reactivity of triplet β -lapachone-3-sulfonic acid towards biological substrates **J. Braz. Chem. Soc.** 2010, 21, 966-972.
- [11] BARREIRO, Eliezer J. et al . Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 20, n. 3, p. 300-310, 1997 .
- [12] BARREIRO, E.J. A química medicinal e o paradigma do composto protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n.1, p. 26-34, 2009.
- [13] GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.**, São Paulo , v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010 .
- [14] GUEDES, I. A.; MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophys. Rev.**, 2013.
- [15] HOLMES, K. V. Coronaviruses (Coronaviridae). **Encyclopedia of Virology**, p. 291-298, 1999.
- [16] PAYNE, S. Coronaviridae. **Viruses**, p. 147-158, 2017.
- [17] CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Coronaviruses: genome structure, replication and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**. v. 92, p. 418-423, 2020.
- [18] LI, G.; FAN, Y. LAI, Y.; et al. Coronaviruses infections and immune responses, **J Med Virol**. v. 92, p. 424-432, 2020.
- [19] MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. **Malaysian J Pathol**. v. 42, p. 3-11, 2020.
- [20] BERGMANN, C.; SILVERMANN, R. COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. p. 1-7, 2020.
- [21] SOCIEDAD ARGENTINA DE VIROLOGÍA. Informe SARS COV-2. Disponível em: https://aam.org.ar/src/img_up/22032020.0.pdf, acessado em: setembro de 2020.

[22] ULLRICH S.; NITSCHKE, C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 30, p. 1-8, 2020.

[23] ZHANG, L.; LIN, D.; SUN, X.; CURTH, U.; DROSTEN, C.; et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**. v. 368, p. 409-412, 2020.

[24] SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016.

[25] ARAUJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. bras. farmacogn.**, Maringá, v. 12, supl. 1, p. 57-59, 2002.

[26] RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J.; OLESON, J. J. Recognition and Evaluation of Lapachol as an Antitumor Agent. **Cancer Research**. v. 28, p. 1952-1954, 1968.

[27] ALVES, G. M. C. et al . Purificação e caracterização da beta-lapachona e estudo de estabilidade dos cristais em diferentes condições de armazenamento. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 31, n. 2, p. 413-416, 2008.

[28] SWIDEREK, K.; MOLINER, V.; (2020): Revealing the Molecular Mechanisms of Proteolysis of SARS-CoV-2 Mpro from QM/MM Computational Methods.. **Chem. Sci**. p. 1-5, 2020.

[29] SANTOS, H. F. O conceito de Modelagem Molecular. **Química Nova na Escola**. v. 4, p. 4-5, 2001.

[30] ANDREI, C. C.; et al. **Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular**. 2ª Edição, Editora Manole, Barueri, 2012.

[31] ANDRADE, C. H.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Modelagem Molecular no Ensino de Química Farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 2, p. 1-23, 2010.

- [32] SAN'TANNA, C. M. R. Métodos de Modelagem Molecular para o Estudo e Planejamento de Compostos Bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**. v. 1, p. 49-57, 2009.
- [33] VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da Química Medicinal: A Flexibilidade dos Ligantes e Receptores. **Quim. Nova**. v. 28, p. 95-102, 2005.
- [34] FOKOUE, H. H.; PINHEIRO, P. S. M.; FRAGA, C. A. M; SANT 'ANNA, C. M. R. Há Algo Novo no Reconhecimento Molecular Aplicado à Química Medicinal?. **Quim. Nova**. v. 43, p. 78-89, 2020.
- [35] BARREIRO, E.J; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3ª Edição, Editora ArtMed, Porto Alegre, 2015.
- [36] BATISTA, V. S.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M. Molecular Docking: Considerations of a Low Cost and Suitable Methodology and Some Successfull Applications. **Med & Analy Int J**. v. 2. p. 1-13, 2018.
- [37] AZEVEDO, W. F. **Docking Screens for Drug Discovery**. Editora Humana Press, 2019.
- [38] VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. 1ª Edição, SBBq, São Paulo, 2014.
- [39] DockThor a receptor-ligand docking program. Disponível em <https://dockthor.lncc.br/v2/>, acessado em setembro de 2020.
- [40] XAVIER, M. M.; HECK, G. S.; DE AVILA M.B.; LEVIN, N.M.; PINTRO, V. O.; CARVALHO, N.L. et al. SAnDReS a computational tool for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. **Comb Chem High Throughput Screen**. v. 19, p. 801-812, 2016.

- [41] MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Computational Chemistry**. v. 16, p. 2785-91, 2009.
- [42] KOLLMAN, P. A.; CHANDRA, S. U. An approach to computing electrostatic charges for molecules. **J. Computational Chemistry**. v. 5, p. 129-145, 1984.
- [43] CHEMAXON. MarvinSketch v. 20.18. <https://www.chemaxon.com>.
- [44] HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMERRSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **J. Of Cheminformatics**. v. 4, p. 1-17, 2012.
- [45] HALGREN, T. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parametrization, and performance of MMFF94. **J. Of Computational Chemistry**. v. 17, p. 490-519, 1996.
- [46] STEWART, J. J. P. MOPAC2016. **Stewart Computational Chemistry**, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net), 2016.
- [47] STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. **J. Mol. Modelling**. v. 19, p. 1-32, 2013.
- [48] GASTEIGER, J.; MARSILI, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. **Tetrahedron Letters**. v. 19, p. 3181-3184, 1978.
- [49] PYMOL. The PyMOL Molecular Graphics System, Versão 2.4.1 Schrodinger, LLC.
- [50] TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem**. v. 31, p. 455-461, 2010.

- [51] PHOSRITHONG, N.; UNGWITAYATORN, J. Molecular docking study of anticancer activity of plant-derived natural products. **Med Chem Res.** v. 19, p. 817-835, 2010.
- [52] LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLIS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interactions diagrams for drug discovery. **J. Chem. Inf. Model.** v. 51, p. 2778-2786, 2011.
- [53] VASCONCELLOS, M. L. A. A. A teoria de Pearson para a disciplina de Química Orgânica: Um exercício prático e teórico aplicado em sala de aula. **Quím. Nova.** v. 37, n. 1, p. 171-175, 2014.
- [54] HENEVER, K. E.; ZHAO, W.; BALL, D. M.; BABAOGLU, K. Q. J.; WHITE, S. W.; LEE, R. E. Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. **J. Chem. Inf Model.** v. 42, p. 444-460, 2010.
- [55] OLIVEIRA, A. M. **Introdução à modelagem molecular para química, engenharia e biomédicas**: fundamentos e exercícios. 1ª edição, Editora Appris, Curitiba, 2018.