



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA**

WALLISON DOS SANTOS DIAS

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTITROMBÓTICO DE DÍMEROS DE
FLAVONOIDES SULFATADOS**

**AREIA
2023**

WALLISON DOS SANTOS DIAS

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTITROMBÓTICO DE DÍMEROS DE
FLAVONOIDES SULFATADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial à obtenção do título bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Ramos de Santana.

**AREIA
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D541a Dias, Wallison dos Santos.

Avaliação in silico do potencial antitrombótico de dímeros de flavonoides sulfatados / Wallison dos Santos Dias. - Areia:UFPB/CCA, 2021.

56 f. : il.

Orientação: Sidney Ramos de Santana.

TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Química. 2. Flavonoides Sulfatados. 3. Trombose.
4. Docking Molecular. I. Santana, Sidney Ramos de. II.
Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 54(02)

WALLISON DOS SANTOS DIAS

AVALIAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL ANTITROMBÓTICO DE DÍMEROS DE
FLAVONOIDES SULFATADOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada
ao Curso de Bacharelado em Química da
Universidade Federal da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Química.

Aprovado em: 15/12/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sidney Ramos de Santana (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (DQF - UFPB – Campus II)



Prof. Dr. Renaldo Tenório de Moura Júnior
Universidade Federal da Paraíba (DQF- UFPB – Campus II)



Prof. Dr. Elton José Ferreira Chaves
Universidade Federal da Paraíba (CBiotec- UFPB – Campus I)

*Aos meus pais, **José Irenildo Silva Dias e Maria Simone Paulino dos Santos Dias**, dedico este trabalho, sem os quais, nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar ao meu DEUS, na pessoa do meu Senhor JESUS, sem o qual, nada do que foi feito se fez, por me manter firme em momentos de adversidade, me concedendo perseverança, paciência, dedicação, e sabedoria. A ele seja toda honra e glória dessa conquista. *Ao Senhor digo, obrigado.*

Agradeço aos meus pais, *José Irenildo* e *Maria Simone*, por todo o ensinamento que me proporcionaram, por cada vez que abriram mão de si mesmos para me oferecer algo melhor, por todas as noites que passaram em claro, por toda a preocupação, todo o incentivo, todo o zelo. Fizeram tudo o que estava ao seu alcance pra que hoje eu estivesse onde estou. *Aos meus pais, digo obrigado.*

Aos meus avós maternos, *José Edson* e *Maria de Lourdes*, e meus avós paternos (*in memoriam*) *Amarina Santina* e *Pedro Nicolau*, por todo o carinho, todo amor e cuidado. *Aos meus avós, digo obrigado.*

À minha noiva, *Raquel Cavalcanti*, por todo o incentivo, companheirismo, pelas ligações demoradas quando estávamos longe um do outro, por cada gesto de carinho, por cada abraço reconfortante em situações adversas, e pela minha preocupação com a minha saúde física e mental. Não sei o que seria de mim sem você. *A você digo, obrigado.*

Ao meu orientador *Sidney Santana*, agradeço por todos os ensinamentos, pela dedicação, pela paciência, pelo cuidado, por acreditar em mim, por me acolher no seu grupo de pesquisa, por aceitar o desafio de construirmos um trabalho juntos, e por me proporcionar três (de muitos por vir) produtivos e memoráveis anos. É um privilégio ser seu orientando. *A você digo, obrigado.*

Agradeço aos meus amigos, que na ausência dos meus parentes, foram minha família enquanto estive longe de casa: *Davy, Wellington, Anderson, Francisco Júnior, Carlos Júnior, Karol, Eliercio, Luciana, Angeliana, Ilário, Viviane, Janaína, Débora, Amanda, Érika, Vinícius, Davi, Geandson*. Vocês deram um novo significado para o termo “lar”. *A vocês digo, obrigado.*

Agradeço a todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender e ser edificado, em especial, ao corpo docente do Departamento de Química e Física, bem como os técnicos *Tereziana, Deydeby, e Helane*. Foi um honra e um privilégio, ser instruído e edificado através do conhecimento que vocês me proporcionaram. *A vocês digo, obrigado.*

Soli Deo Gloria!

RESUMO

Coágulos sanguíneos são um agregado de plaquetas em ligações cruzadas, estabilizadas por fibras proteicas, formados por meio de uma cascata regulatória, chamada de cascata de coagulação. A heparina é um polissacarídeo sulfatado intracelular que quando liga-se à Antitrombina, proteína inibidora da cascata de coagulação, aumenta a sua afinidade pela trombina e pelo fator de coagulação Xa. A heparina tem ocorrência natural, porém, em quantidade insuficiente para influenciar na coagulação. Estudos indicam que a atividade antitrombótica da heparina está associada ao grupo sulfato, o que leva a deduzir que flavonoides sulfatados podem se ligar nos mesmos receptores que a heparina, e portanto, são potenciais candidatos a fármacos contra a trombose. Visto isso, objetivou-se avaliar a eficiência de moléculas baseadas em flavonoides sulfatados publicados frente a proteínas associadas à trombose por meio de simulações de *docking* molecular, comparando o seu desempenho com moléculas com atividade antitrombótica conhecida, obtidas em no banco de dados BindingDB. O *docking* molecular se mostrou um método eficaz e confiável. As moléculas propostas mostraram grande afinidade de interação com proteínas associadas à cascata de coagulação, apresentando desempenho superior ao conjunto de ligantes tomados por referência. Os dados corroboram para a confirmação da hipótese de que as moléculas aqui propostas possuem acentuado potencial antitrombótico e são, portanto, potenciais candidatos à fármacos contra a trombose.

Palavras-Chave: Flavonoides sulfatados; Trombose; *Docking* molecular.

ABSTRACT

Blood clots are an aggregate of cross-linked platelets, stabilized by protein fibers, formed through a regulatory cascade, called coagulation cascade. Heparin is an intracellular sulphated polysaccharide that, when it binds to Antithrombin, a protein that inhibits the coagulation cascade, increases its affinity for thrombin and factor Xa. Heparin is naturally occurring, however, in a insufficient quantity to influence coagulation. Studies indicate that the antithrombotic activity of heparin is associated with the sulphate group, which leads to the inference that sulphated flavonoids may bind to the same receptors as heparin, and therefore, are potential drug candidates against thrombosis. Therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of sulfated flavonoid-based molecules against thrombosis-associated proteins through molecular *docking* simulations, comparing their performance with molecules with known antithrombotic activity, obtained from the BindingDB database. Molecular *docking* proved to be an effective and reliable method. The proposed molecules showed great affinity of interaction with proteins associated with the coagulation cascade, presenting superior performance to the set of ligands taken by reference. The data corroborate the hypothesis that the molecules proposed here have marked antithrombotic potential and are, therefore, potential candidates for drugs against thrombosis.

Keywords: Sulphated flavonoids; Thrombosis; Molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação da Estrutura Química da Heparina.....	12
Figura 2	Representação da conversão do Fibrinogênio em Fibrina.....	15
Figura 3	Cascata de Coagulação.....	17
Figura 4	Representação da conversão do Fibrinogênio em Fibrina.....	18
Figura 5	Estrutura Básica dos Flavonoides.....	20
Figura 6	Dímeros de Flavonoides Sulfatados baseado em éteres.....	27
Figura 7	Dímeros de Flavonoides Sulfatados baseado em Éteres.....	29
Figura 8	Dipedroina.....	30
Figura 9	Validação visual para o alvo 2FDA.....	39
Figura 10	Validação visual para o alvo 3SOR.....	40
Figura 11	Validação visual para o alvo 4CR9.....	40
Figura 12	Validação visual para o alvo 4XP6.....	41
Figura 13	Validação visual para o alvo 5Q0D.....	41
Figura 14	Validação visual para o alvo 6HHC.....	42
Figura 15	Validação visual para o alvo 6TWC.....	42
Figura 16	Validação visual para o alvo 6USY.....	43
Figura 17	Validação visual para o alvo 6W50.....	43
Figura 18	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 2FDA.....	44
Figura 19	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 3SOR.....	45
Figura 20	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 4CR9.....	45
Figura 21	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 4XP6.....	46
Figura 22	Interações intermoleculares do LCC no sítio ativo alvo 5Q0D.....	46
Figura 23	Interações intermoleculares do Ligante proposto no sítio ativo alvo 5Q0D.....	47
Figura 24	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6HHC.....	48
Figura 25	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6TWC.....	49
Figura 26	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6USY.....	50
Figura 27	Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6W50.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de energia livre de ligação obtidos no primeiro ensaio de Docking.....	32
Tabela 2	Valores de energia livre de ligação utilizando a função de scoring Dkoes e gridbox de 50 Å ³	34
Tabela 3	Valores de energia livre de ligação utilizando a função de scoring Vinardo e gridbox de 50 Å ³	34
Tabela 4	Valores de energia livre de ligação utilizando a função de scoring Dkoes e gridbox de 30 Å ³	35
Tabela 5	Valores de energia livre de ligação utilizando a função de scoring Vinardo e gridbox de 30 Å ³	35
Tabela 6	Valores de energia livre de ligação removendo-se as águas de cristalização.....	37
Tabela 7	Valores de energia livre de ligação mantendo-se as águas de cristalização.....	37
Tabela 8	Valores do RMSD para validação do método.....	38
Tabela 9	Valores de energia livre de ligação obtidos no Redocking.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPCR	Endotelial Protein C Receptor
FS	Flavonoides Sulfatados
MS	Mebólitos Secundários
PBD	Protein Data Bank
PC	Proteína C
PCa	Proteína C ativada
RCSB	Research Collaboratory for Structural Bioinformatics
RMSD	Root Mean Square Deviation
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue factor plasminogen inhibitor
UCSF	University of California San Francisco
VS	Virtual Screening
LCC	Ligante Co-cristalizado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral:.....	13
2.2 Objetivos Específicos:.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Cascata de Coagulação.....	14
3.2 Mecanismo de Ação da Heparina.....	19
3.3 Flavonoides Sulfatados.....	20
3.4 Docking Molecular.....	21
3.4.1 Descoberta e Planejamento de Fármacos.....	21
3.4.2 Docking Molecular.....	22
3.4.3 Reconhecimento Molecular.....	23
3.4.4 Preparação do Sistema.....	24
3.4.5 Algoritmo de Busca.....	24
3.4.6 Função de Scoring.....	24
3.4.7 Virtual Screening.....	25
4 METODOLOGIA	25
4.1 Docking Molecular.....	25
4.1.1 Obtenção das Estruturas.....	26
4.1.2 Preparação do Sistema.....	27
4.1.3 Execução dos Cálculos.....	28
4.2 Validação do Método.....	30
4.3 <i>Redocking</i>	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Primeiro Ensaio de Docking.....	32
5.2 Segundo Ensaio de Docking.....	33
5.3 Terceiro Ensaio de Docking.....	36
5.4 Validação do Método.....	38
5.5 <i>Redocking</i>	52
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

Coágulos sanguíneos são um agregado de plaquetas em ligações cruzadas, estabilizadas por fibras proteicas, formados por meio de uma cascata regulatória, chamada de cascata de coagulação, que ocorre por meio da ativação do zimogênio fibrinogênio na sua forma ativada, fibrina (FERRIER, 2019; NELSON, 2014).

São conhecidas três vias que estão relacionadas na formação do coágulo sanguíneo, a via comum, a via extrínseca, e a via intrínseca. As duas últimas cascatas regulatórias mencionadas estão correlacionadas, e ambas têm por finalidade produção de fibrina através da ativação do fibrinogênio (FERRIER, 2019; NELSON, 2014).

A via extrínseca é iniciada segundos após a ocorrência de uma lesão que exponha o fator tecidual, glicoproteína acessória, o qual se liga a uma enzima da cascata de coagulação, aqui chamada de fator de coagulação VII, promovendo uma mudança conformacional, através de uma clivagem proteolítica, tornando-a em sua forma ativa, mediante a presença de íons Ca^{2+} e fosfolipídeos (FERRIER, 2019; NELSON, 2014; JUNQUEIRA, 2018).

Uma vez que isso ocorre, é formado um complexo entre o fator tecidual e a forma ativada do fator de coagulação VII, agora chamado de fator VIIa. O complexo formado se liga ao fator de coagulação X, convertendo esta enzima em sua forma ativa, fator Xa, por meio de um processo de proteólise, ou seja, a hidrólise das ligações peptídicas da proteína (FERRIER, 2019).

A via intrínseca ocorre em duas fases, a fase de contato, e a fase de ativação do fator X. Na fase de contato, o fator XII, interage com fosfolipídeos aniônicos encontrados na superfície plaquetária no local da lesão, convertendo o fator XII a sua forma ativa, fator XIIa (FERRIER, 2019; NELSON, 2014).

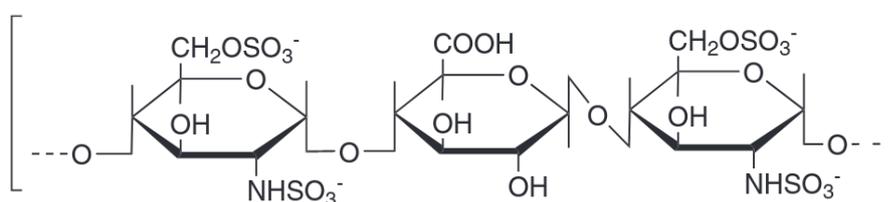
Após isso, o cininogênio de alto peso molecular (CAPM), adere o fator XI à superfície da plaqueta, onde é convertido em XIa pelo fator XIIa (CARLOS, 2007; FRANCO, 2001). O fator XIa forma um complexo com o fator VIIIa, que interage com fosfolipídeos da superfície plaquetária, e atua sobre o fator X, ativando-o, formando o fator Xa (FERRIER, 2019; NELSON, 2014, CARLOS, 2007; FRANCO, 2001).

A via comum é iniciada quando o fator Xa, resultante das vias intrínseca e extrínseca, é combinado com o fator Va, cálcio e com fosfolipídios teciduais ou plaquetários, e forma o complexo protrombinase, o qual converte a protrombina em trombina (FERRIER, 2019; NELSON, 2007; PALTA, 2014). A trombina atua na conversão do fibrinogênio em

monômeros de fibrina, e a ativação do fator XIII em XIIIa, que na presença de íons Ca^{2+} , catalisa a transformação dos coágulos solúveis de fibrina, em coágulos firmes (CARLOS, 2007; PALTA, 2014).

A heparina é um polissacarídeo sulfatado intracelular, com capacidade anticoagulante, pois uma vez que esta liga-se à Antitrombina, proteína inibidora da cascata de coagulação, aumenta a sua afinidade pela trombina e pelo fator Xa (FERRIER, 2019; STRYER, 2017; NELSON, 2014, PALTA, 2014; FRANCO, 2001). A heparina tem ocorrência natural em diversos organismos biológicos, porém, em quantidade insuficiente pra contribuir de forma significativa na coagulação (FERRIER, 2019; NELSON, 2014; PALTA, 2014).

Figura 1. Representação da Estrutura Química da Heparina.



Fonte: Química Nova, v. 33, n. 1, 172-180, 2010

Dados obtidos na literatura indicam que a antitrombina possui uma cavidade que retém moléculas de água (MOSIER, 2012), e estas são liberadas quando a antitrombina liga-se à heparina (CORREIA-DA-SILVA, 2013). Estudos indicam (CORREIA-DA-SILVA, 2013) que essa interação ocorre comumente em função do grupo sulfato, o que leva a deduzir que esses processos podem ser conduzidos por pequenas moléculas sulfatadas.

Visto isso, aparentemente, flavonoides sulfatados podem se ligar nos mesmos receptores que a heparina, portanto, são potenciais candidatos no desenvolvimento de novos fármacos contra a trombose (TELES et al, 2015; TELES et al, 2018).

O processo de descoberta e planejamento de novos fármacos é caro, um custo estimado em torno de 800 milhões, e demorado, levam de 10 a 20 anos até levar um novo fármaco às prateleiras (VERLI, 2014). Tendo isso em vista, métodos computacionais têm sido desenvolvidos para investigar as interações ligante-proteína, para redução o custo e o tempo necessários para a execução do processo (VERLI, 2014; KADUKOVA, 2017; GOVINDARAJ, 2018). O docking molecular e a dinâmica molecular são ferramentas computacionais complementares que desempenham um papel importante no processo de planejamento racional de fármacos (VERLI, 2014; LAPE, 2010).

O *docking* molecular é um método computacional utilizado para prever a posição, orientação e conformação mais provável em que uma molécula se liga no sítio ativo de uma macromolécula (BJERRUM, 2016; GIMENO, 2019; QUIROGA, 2016; PAGADALA, 2016). Por meio do *docking*, é possível também prever a afinidade de moléculas ligantes a receptores calculando a energia livre de ligação do complexo, levando em consideração as interações entre os componentes, a solvatação e contribuição entrópicas, além de ranquear os ligantes em função da energia de ligação obtida (KADUKOVA, 2017; LAPE, 2010; LE GLILLOUX, 2009; BJERRUM, 2016).

A técnica é formada por dois componentes essenciais, uma função de *scoring*, que atribui um valor numérico a cada conformação do complexo ligante-receptor, e um algoritmo de busca que identifica a conformação do ligante com maior afinidade ao sítio de ligação da molécula receptora (LAPE, 2010; VERLI, 2014).

Funções de *scoring* são modelos matemáticos, composto por termos associados às propriedades físico-químicas envolvidas na interação receptor-ligante, usados em associação com algoritmos de busca. As funções de *scoring* predizem a força de interação de cada conformação do ligante com o alvo, enquanto algoritmos de busca, identificam as conformações possíveis em que as moléculas se ligam ao alvo (VERLI, 2014; GIMENO, 2019).

Portanto, ressalta-se a importância de se determinar a afinidade de flavonoides sulfatados, bem como compostos derivados destes, com proteínas associadas à cascata de coagulação afim de que se avalie o seu potencial antitrombótico. Para isto, o *docking* molecular é a ferramenta ideal, uma vez que se mostrou uma técnica acessível, prática e confiável.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho tem como objetivo determinar a afinidade de ligação relativa de moléculas baseadas em flavonoides sulfatados publicados por (TELES et al., 2015) à proteínas associadas à cascata de coagulação sanguínea por meio de simulações de *docking* molecular.

2.2 Objetivos Específicos:

Os objetivos específicos deste projeto são:

- ✓ Determinar a afinidade de ligação relativa de moléculas baseadas em flavonoides sulfatados publicados por TELES et al, 2015 ao fator de coagulação XI, enzima associada à trombose,
- ✓ Realizar um estudo de docking molecular para prever o modo de ligação e a energia livre de ligação dos flavonoides sulfatados em relação às proteínas relacionadas à trombose;
- ✓ Avaliar o desempenho das moléculas em estudo tomando por referência moléculas de eficiência conhecida.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cascata de Coagulação

Cascatas regulatórias (também chamadas de cascatas proteolíticas, ou cascatas enzimáticas) são comumente observados em sistemas bioquímicos quando se deseja obter uma resposta rápida, e ela se dá quando, através de um sinal químico, uma proteína é ativada, desencadeando a ativação de uma série de outras proteínas, onde esse processo é catalisado por enzimas, de modo que o sinal é amplificado a cada etapa (STRYER, 2017; NELSON, 2014).

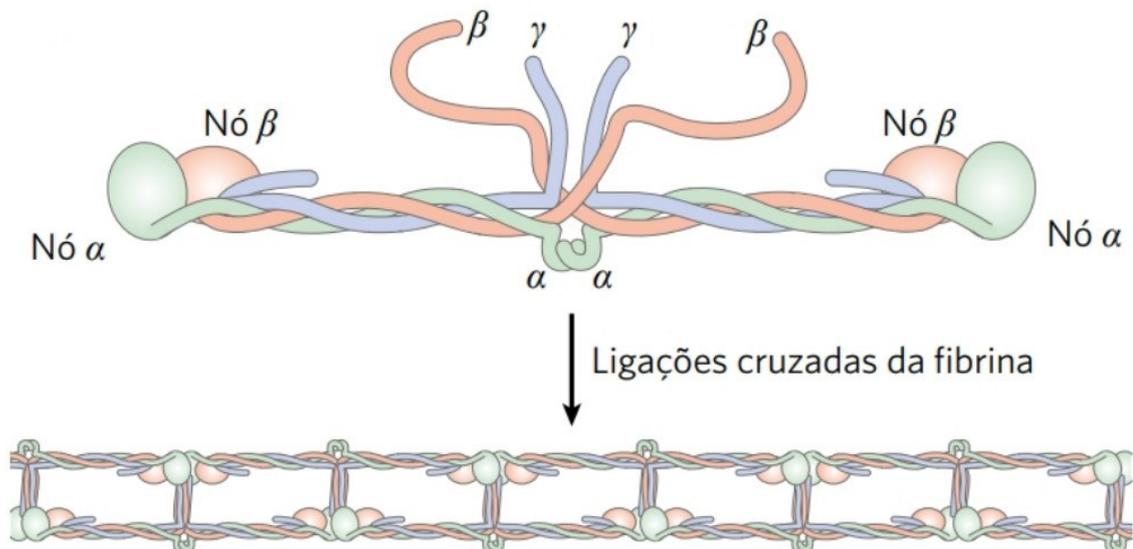
Certas enzimas, como as enzimas proteolíticas, são sintetizadas na forma de precursores inativos, denominados zimogênios (NELSON, 2014). O zimogênio é convertido na sua forma ativa irreversivelmente, quando este sofre a hidrólise de determinadas ligações peptídicas, removendo um segmento da cadeia de aminoácidos (CAMPBELL, 2015; MARZZOCO, 2018) Com isso, o zimogênio adquire as propriedades de enzima, uma vez que estas clivagens específicas promovem mudanças conformacionais que expõem o sítio ativo da enzima (NELSON, 2014).

De forma semelhante, os coágulos sanguíneos são um agregado de plaquetas em ligações cruzadas, estabilizadas por fibras proteicas, formados por meio de uma cascata

regulatória, chamada de cascata de coagulação, que ocorre por meio da ativação do zimogênio fibrinogênio na sua forma ativada, denominada fibrina (NELSON, 2014; STRYER, 2017).

O fibrinogênio é um dímero de heterodímeros, formado por três unidades globulares conectadas por dois bastonetes (espirais α -coloidais de três fitas), e consiste em seis cadeias $[(A\alpha)_2(B\beta)_2(\gamma)_2]$ (NELSON, 2014; STRYER, 2017). O fibrinogênio é convertido em fibrina, uma vez que quatro ligações peptídicas Arginina-Glicina na região globular central do fibrinogênio são clivadas por meio da ação enzimática da trombina, promovendo a remoção proteolítica do peptídeo A de 18 resíduos das extremidades de ambas as cadeias $A\alpha$, e do peptídeo B de 20 resíduos das extremidades de cada uma das cadeias $B\beta$. (STRYER, 2017; BROWN, 2018). Dessa forma, transformando o fibrinogênio em um monômero de fibrina $[(\alpha)_2(\beta)_2(\gamma)_2]$, ativa para a coagulação sanguínea (STRYER, 2017; NELSON, 2014).

Figura 2. Representação da conversão do Fibrinogênio em Fibrina.



Fonte: NELSON, 2014

Em decorrência da remoção proteolítica dos peptídeos A e B, os monômeros de fibrina associam-se, de forma “desorganizada”, formando um coágulo frouxo e solúvel. Em seguida, são formadas ligações amídicas cruzadas entre o grupo γ -carboxamida de alguns resíduos glutamina de das fibrinas que compõem o coágulo frouxo com o grupo ϵ -amino de alguns resíduos lisina de outra fibrina, de forma covalente. Esta ligação é catalisada por uma transglutaminase conhecida como fator FXIIIa, e ela torna o coágulo rígido e insolúvel (FERRIER, 2019; STRYER, 2017; NELSON, 2014).

Abaixo da camada de células epiteliais que revestem os vasos sanguíneos são encontradas moléculas de colágeno. Quando ocorre uma lesão, o colágeno é exposto ao

sangue, em decorrência disso, as plaquetas daquela região são ativadas, o que leva à geração de fosfolipídeos aniônicos na superfície das plaquetas e a liberação de moléculas sinalizadoras, que estimulam a ativação de outras plaquetas. Uma vez que isso acontece, ocorre uma agregação de plaquetas ativadas no local da lesão, formando um coágulo mole (NELSON, 2014).

São conhecidas três vias que estão relacionadas na formação do coágulo sanguíneo, a via comum, a via extrínseca, e a via intrínseca. As duas últimas cascatas regulatórias mencionadas estão correlacionadas, e ambas têm por finalidade produção de fibrina através da ativação do fibrinogênio (FERRIER, 2019; NELSON, 2014).

Todas as vias tem participação de fatores proteicos, identificados por algarismos romanos, alguns deles são serino-proteases, produzidas por zimogênios sintetizados no fígado e transportados pelo sangue, outras são proteínas regulatórias que auxiliam na sua ativação (NELSON, 2014).

A via extrínseca envolve uma glicoproteína transmembrana chamada de fator tecidual. Ela não é encontrada no sangue, mas no subendotélio vascular, região entre a parede interna e a parede externa dos vasos sanguíneos, e não se trata de uma protease, mas sim de uma proteína acessória extravascular (FERRIER, 2019; NELSON, 2014; JUNQUEIRA, 2018).

A via extrínseca é iniciada segundos após a ocorrência de uma lesão que exponha o fator tecidual, o qual se liga ao fator VII, uma proteína circulante que contém resíduos Gla (γ -carboxiglutamato), o que a promove uma mudança conformacional, através de uma clivagem proteolítica, catalisada pelo fator Xa, tornando-a em sua forma ativa, mediante a presença de íons Ca^{2+} e fosfolipídeos (FERRIER, 2019; NELSON, 2014). Uma vez que isso ocorre, o complexo formado se liga ao fator X, convertendo-o na sua forma ativa, fator Xa, por meio de proteólise (FERRIER, 2019).

É possível perceber uma interdependência entre o fator X e o complexo VIIa, uma vez que o complexo TF-VIIa é necessário para clivar o fator X, de forma semelhante, o fator X ativado (Xa) é necessário para clivar o complexo TF-VIIa. Esse aparente paradoxo é explicado em função de que uma pequena quantidade do fator VIIa está sempre presente no sangue, em quantidade suficiente para a formação do complexo TF-VIIa, qual é ativado de forma imediata mediante uma lesão tecidual (NELSON, 2014).

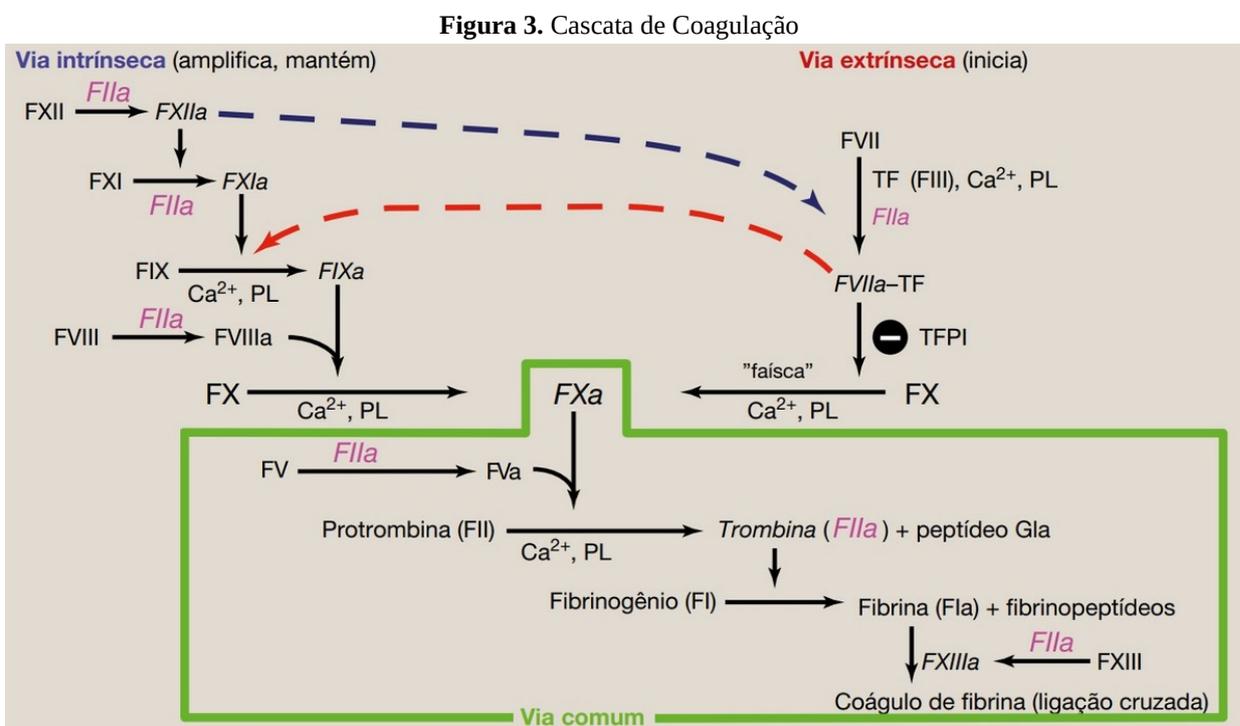
A via intrínseca recebe esse nome em função de que todos os fatores que a compõe são intravasculares, ou seja, estão presentes no sangue. Esta via ocorre em duas fases, a fase de contato, e a fase de ativação do fator X. Na fase de contato, o fator XII, também chamado de fator Hageman, interage com fosfolipídeos aniônicos encontrados na superfície plaquetária no

local da lesão, provocando uma alteração na sua conformação, o que promove o fator XII a sua forma ativa (FERRIER, 2019; NELSON, 2014).

Após isso, o Cininogênio de alto peso molecular (CAPM), um cofator enzimático, promove a adesão do fator XI à superfície da plaqueta, é convertido em XIa pelo fator XIIa (CARLOS, 2007; FRANCO, 2001). O fator XIa, por sua vez, interage com o fator VIIIa, formando um complexo relativamente estável, que interage com fosfolipídeos da superfície plaquetária, e atua sobre de forma enzimática sobre o fator X, ativando-o, formando o fator Xa (FERRIER, 2019; NELSON, 2014; CARLOS, 2007; FRANCO, 2001).

A via comum é iniciada quando o fator Xa, resultante das vias intrínseca e extrínseca, é combinado com o fator Va, cálcio e com fosfolipídios teciduais ou plaquetários, e forma o complexo protrombinase, o qual converte a protrombina em trombina por meio de clivagem proteolítica (FERRIER, 2019; CARLOS, 2007; PALTA, 2014).

A atuação do cálcio nesse processo consiste em que ele se liga aos resíduos Gla da protrombina, facilitando que este se ligue à membrana e ao complexo protrombinase (FERRIER, 2019). A trombina atua na conversão do fibrinogênio em monômeros de fibrina, e a ativação do fator XIII em XIIIa, que na presença de íons Ca^{2+} , catalisa a transformação dos coágulos solúveis de fibrina, em coágulos firmes (CARLOS, 2007; PALTA, 2014).



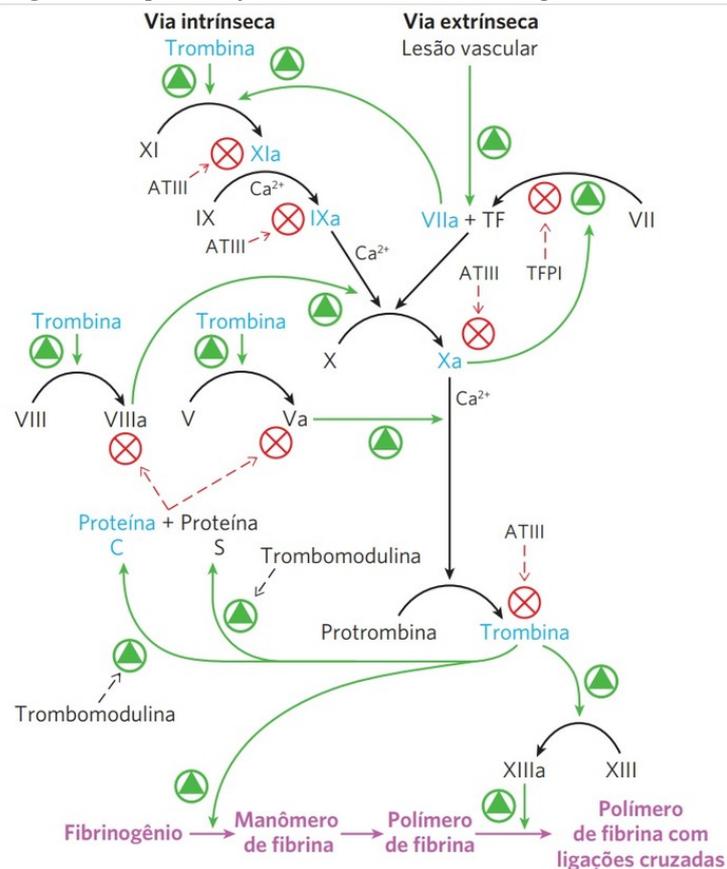
Fonte: FERRIER, 2019

A hemostasia pode ser definida como o estancamento do sangue, e ocorre quando há um equilíbrio entre fatores vasculares e sanguíneos. Uma vez que esse equilíbrio é atingido, pode ocorrer desde a obstrução de vasos intactos por formação de trombos (trombose) até a perda de sangue (hemorragia).

A anticoagulação, bem como a fibrinólise são aspectos fundamentais para a hemostasia, e ocorrem quando proteínas inativam os fatores de coagulação, pela remoção da circulação sanguínea ou pela degradação (CARLOS, 2007; PALTA, 2014; FERRIER, 2019).

A anticoagulação ocorre por diferentes vias, dentre as quais estão a via da Antitrombina, a via inibidora do fator tecidual e a via da proteína C. Na Figura X estão representadas as vias de anticoagulação e a relação destas com as vias que compõem a cascata de coagulação.

Figura 4. Representação da conversão do Fibrinogênio em Fibrina.



Fonte: NELSON, 2014

A antitrombina, antes chamada de antitrombina III, é uma proteína hepática que circula pelo sangue, inibidora primária da trombina, uma vez que esta liga-se à trombina e a

transporta até o fígado, removendo-a da circulação sanguínea, impossibilitando a sua participação da cascata de coagulação.

Além da trombina, a antitrombina inibe também algumas serino-proteases da cascata de coagulação, fator IXa, XIa, XIIa, além do complexo TF-VIIa (FERRIER, 2019; FRANCO, 2001). A inibição se dá pela formação de uma ligação entre um resíduo Arg da antitrombina e um resíduo Ser do sítio ativo das serino-proteases (NELSON, 2014).

A via inibidora de fator tecidual, ou TFPI (do inglês Tissue factor plasminogen inhibitor), é uma proteína produzida por células do endotélio, que se ligam e inibem o fator Xa e o complexo TF-VIIa, qual ativa os fatores IX e X, atuando como um inibidor natural da via extrínseca (PALTA, 2014; FRANCO, 2001).

A proteína C (PC) é uma serino-protease produzida no fígado, que quando ligado ao seu receptor, EPCR (endotelial PC receptor), é ativado pelo complexo trombina-trombomodulina, convertendo-o em PCa (Proteína C ativada). Na formação do complexo, ao se ligar com a trombina, a trombomodulina reduz a sua afinidade pela proteína C.

A PCa cliva e desativa os fatores de coagulação Va e VIIIa, de modo a inibir a coagulação, e este processo é potencializado na presença da proteína S (glicoproteína dependente de vitamina K), que ajuda a fixação da PCa ao coágulo, atuando como um cofator não enzimático (FERRIER, 2019; PALTA, 2014; FRANCO, 2001; NELSON, 2014).

3.2 Mecanismo de Ação da Heparina

A heparina é um polissacarídeo sulfatado intracelular, com capacidade anticoagulante encontrado em mastócitos associados à parede de vasos sanguíneos, e é liberado quando o vaso sofre algum tipo de lesão (FERRIER, 2019; STRYER, 2017; NELSON, 2014). A heparina possui atividade anticoagulante, pois uma vez que esta se liga à Antitrombina, aumenta a sua afinidade pela trombina e pelo fator Xa, elementos chave da coagulação sanguínea, induzindo a formação de complexos irreversíveis, o que lhe confere uma atividade anticoagulante (FERRIER, 2019; STRYER, 2017; NELSON, 2014, PALTA, 2014; FRANCO, 2001).

No entanto, apesar de ocorrer de forma natural em diversos organismos biológicos, a quantidade de heparina presente no plasma sanguíneo, é insuficiente pra contribuir de forma significativa na coagulação, em função disso, comumente a heparina purificada é usada como agente terapêutico para inibir a formação de trombos na corrente sanguínea, principalmente

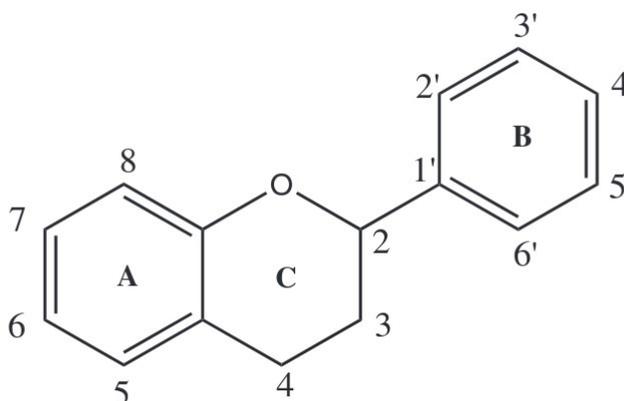
em vasos sanguíneo não danificados (FERRIER, 2019; STRYER, 2017; NELSON, 2014, PALTA, 2014).

3.3 Flavonoides Sulfatados

Metabólitos secundários (MS) são compostos especializados produzidos por plantas e microrganismos, que não participam do metabolismo central, produzidos normalmente em função de mudanças ambientais. Esses compostos são produzidos normalmente em função da adaptação do organismo a uma nova condição ambiental ou como mecanismo de defesa contra predadores ou patógenos. Diversas plantas apresentam uma grande variedade de MS, o que tem motivado várias pesquisas no campo da fitoquímica, com interesse em seus compostos e derivados (TELES et al, 2015).

Dentre os grupos mais notáveis de MS, estão os polifenóis, um grupo variado de compostos, e em função da sua diversidade, é devido em classes, e dentre elas estão os flavonoides. Flavonoides são caracterizados pelo núcleo 2-fenil-benzil-pirona, e são encontrados relatos na literatura a respeito das suas atividades biológicas e farmacológicas, como prevenção de doenças cardiovasculares, isquemia, inflamação e outras (TELES et al, 2018).

Figura 5. Estrutura Básica dos Flavonoides.



Fonte: Química Nova, v. 34, n. 9, 1651-1655, 2011

Em meio natural, flavonoides podem sofrer alterações em sua estrutura, como acilação, metilação, glicosilação, e sulfonação, o que influencia nas suas propriedades físico-químicas e atividades biológicas, dando origem a novos tipos de flavonoides e derivados, como os Flavonoides Sulfatados (FS) (TELES et al, 2018). FS são um grupo muito incomum

de derivados de flavonoides, encontrados em família específicas de plantas, caracterizado por uma ou mais ligações esterificadas com sulfato em sua estrutura (TELES et al, 2015; TELES et al, 2018).

No metabolismo de plantas, FS são considerados uma evolução ecológica, como mecanismo de defesa contra herbívoros ou adaptação frente a mudanças no ambiente. Estes compostos polifenólicos exercem funções importantes, como a regulação do crescimento da planta, uma vez que ele se liga com o receptor do ácido naftilftalâmico, bloqueando a inibição do efluxo de auxinas. Outra função exercida por eles é a co-pigmentação, através da formação de um complexo estável com pigmentos de outros compostos polifenólicos, como antocianinas, intensificando a cor natural (TELES et al, 2015; TELES et al, 2018; CORREIA-DA-SILVA, 2013).

A polaridade acentuada dos FS se deve ao em decorrência do grupo sulfato carregado negativamente, que influencia de forma positiva a interação desses compostos com alvos biológicos, como enzimas ou proteínas. Em função disso, FS são potenciais candidatos no desenvolvimento de novos fármacos (TELES et al, 2015; TELES et al, 2018). Diversas atividades biológicas desses compostos têm sido estudadas, bem como atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, anticoagulante e inibição de agregação plaquetária, onde as duas últimas são amplamente investigadas (CORREIA-DA-SILVA, 2013; TELES et al, 2018).

Dados obtidos na literatura indicam que a antitrombina, proteína inibidora da cascata de coagulação, possui uma cavidade que retém moléculas de água, e estas são liberadas quando a antitrombina liga-se à heparina. Estudos descritos por CORREIA-DA-SILVA, 2013 indicam que essa interação ocorre comumente em função do grupo sulfato, o que leva a deduzir que esses processos podem ser conduzidos por pequenas moléculas sulfatadas. Visto isso, aparentemente, FS podem se ligar nos mesmos receptores que a heparina (TELES et al, 2018).

Estudos na literatura mostra que tem sido investigada a atividade anticoagulante e inibição de agregação plaquetária de determinados FS. A Persicarina, um flavonoide sulfatado, apresentou resultados mais promissores, frente à isorhamnetina, flavonoide não-sulfatado de estrutura semelhante, o que indica que o grupo sulfato potencializa a atividade anticoagulante. Alguns FS sintéticos e derivados também apresentaram atividade anticoagulante, como a quercetina 3,7,30,40-tetrassulfato, quercetina 3-acetil-7,30,40-trissulfato, persulfato de 20,3,30,6-tetrahidroxiflavonol, persulfato de quercetina, e o persulfato de morina (TELES et al, 2018).

3.4 Docking Molecular

3.4.1 Descoberta e Planejamento de Fármacos

O processo de descoberta e planejamento de novos fármacos é caro, um custo estimado em torno de 800 milhões, e demorado, levam de 10 a 20 anos até levar um novo fármaco às prateleiras (VERLI, 2014).

Tendo isso em vista, métodos computacionais têm sido desenvolvidos para investigar as interações ligante-proteína, como uma alternativa de abordagem *in silico* para redução o custo e o tempo necessários para a execução do processo (VERLI, 2014; KADUKOVA, 2017; GOVINDARAJ, 2018). A eficiência desses métodos já foi comprovada em estudos prévios, e já há moléculas aprovadas para uso terapêutico, descobertas ou otimizadas por uso de técnicas computacionais (KADUKOVA, 2017; VERLI, 2014)

A formação de complexos proteína-ligante são eventos termodinâmicos que podem ser descritos por métodos que utilizam de conhecimentos da mecânica quântica, para encontrar um mínimo de energia em uma superfície (KADUKOVA, 2017; LE GLILLOUX, 2009).

Visto a necessidade de descrever sistemas dessa natureza, foi desenvolvido uma técnica computacional denominada docking molecular, através da qual é possível realizar uma análise computacional das interações entre macromoléculas, como proteínas ou trechos de DNA, e pequenos compostos orgânicos. Atualmente, o docking molecular é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica, e desempenha um papel importante no processo de planejamento racional de fármacos (VERLI, 2014; LAPE, 2010).

3.4.2 Docking Molecular

O docking molecular utiliza-se da estrutura cristalina da proteína para predizer a posição, orientação e conformação mais provável em que uma molécula se liga no sítio ativo de uma macromolécula (Gimeno, 2019; GIMENO, 2016; BJERRUM, 2016; PAGADALA, 2016).

Por meio do docking, é possível também prever a afinidade de moléculas ligantes a receptores calculando a energia livre de ligação do complexo, levando em consideração as interações entre os componentes, a solvatação e contribuição entrópicas, além de ranquear os

ligantes em função da energia de ligação obtida (KADUKOVA, 2017; LAPE, 2010; LE GLILLOUX, 2009; BJERRUM, 2016).

O docking é uma ferramenta de grande interesse para a investigação de interações ligante-receptor à nível molecular (LAPE, 2010; VERLI, 2014). A técnica é formada por dois componentes essenciais, uma função de scoring, que atribui um valor numérico à cada conformação do complexo ligante-receptor, e um algoritmo de busca que identifica a conformação do ligante com maior afinidade ao sítio de ligação da molécula receptora (LAPE, 2010; TANCHUK, 2015).

3.4.3 Reconhecimento Molecular

Parte integral de abordagens de docking molecular é o reconhecimento molecular, o qual é fundamentado nas características estruturais e físico-químicas do ligante e receptor, que estão associadas às interações intermoleculares e definem o grau de afinidade entre ambos. Dentre os tipos de interações intermoleculares que podem participar do processo de reconhecimento molecular estão ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações iônicas, interações hidrofóbicas, interações cátion- π , interações π - π envolvendo anéis aromáticos e empilhamento-T, e coordenação com íons metálicos (VERLI, 2014). O reconhecimento molecular é promovido por um conjunto de efeitos de entropia e entalpia, e podem ser estimado por meio da energia livre de Gibbs, o qual possui relação com a constante de equilíbrio de ligação K_{eq} conforme visto na Eq. 1 (VERLI, 2014).

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln(K_{eq}) \quad (1)$$

Em que ΔG é a variação da energia livre de ligação, ΔH é a variação da entalpia do sistema, e ΔS a variação de entropia do sistema. Aqui, R diz respeito à constante termodinâmica dos gases, T a temperatura, e K_{eq} se trata da constante de equilíbrio.

Podem ser definidos limites do sítio ativo da proteína para restringir o espaço ocupado pelo ligante, e essas restrições podem ser definidas durante o *docking* para induzir que o ligante interaja com uma determinada região da proteína, para isso, se fazem necessárias informações prévias da localização do sítio ativo antes do *docking*, de modo a contribuir para uma maior eficiência do processo (GIMENO, 2019; PAGADALA, 2016).

Os primeiros métodos de *docking* baseavam-se no modelo chave-fechadura proposto por Fischer, no qual ligante e receptor eram tratados como corpos rígidos, e a afinidade entre

eles era proporcional ao encaixe geométrico entre ambos (LAPE, 2010; VERLI, 2014). No entanto, é conhecido que em meio biológico, ambos os participantes das interações não se comportam como corpos rígidos (VERLI, 2014).

Visto isso, conforme o avanço das técnicas computacionais, foram desenvolvidos programas de docking baseados na teoria “encaixe-induzido” proposto por Koshland (PAGADALA, 2016; VERLI, 2014; LAPE, 2010). Os programas mais recentes permitem que receptor e ligante sejam tratados como corpos flexíveis ou parcialmente flexíveis, e admite que haja alterações conformacionais em ambos, de modo que um se adapta ao outro (Lape, 2010).

3.4.4 Preparação do Sistema

Assim como em experimentos em bancada, experimentos computacionais também requerem uma preparação prévia do sistema, uma etapa fundamental para o êxito na utilização dessa metodologia. Estruturas cristalinas de proteínas podem apresentar problemas como cadeias laterais incompletas, estados de protonação indefinidos, e a falta de alguns resíduos e átomos de hidrogênio. Alguns parâmetros também precisam ser observados no ligante, dentre os quais podem ser citados o estado de protonação, enantiômero com atividade biológico, estado tautomérico, e a identificação das suas ligações químicas flexíveis, a partir das quais serão geradas múltiplas conformações (VERLI, 2014; GIMENO, 2019).

3.4.5 Algoritmo de Busca

Uma vez que se investiga a interação do tipo ligante-receptor via *docking*, pretende-se encontrar a conformação associada a um mínimo de energia, o qual pode ser relacionado com o modo de ligação do ligante-alvo, uma vez que efeitos associados à termodinâmica do sistema são devidamente modelados (VERLI, 2014). Em função disso, são empregados algoritmos de busca, que identificam as conformações possíveis em que as moléculas se ligam ao alvo, de modo a encontrar a conformação correspondente ao mínimo local de energia (GIMENO, 2019).

3.4.6 Função de Scoring

Funções de *scoring* são modelos matemáticos, composto por termos associados às propriedades físico-químicas envolvidas na interação receptor-ligante. A função de *scoring* é usada em associação com os métodos de busca, e é responsável por prever a força de interação de cada conformação do ligante com o alvo, gerando um valor associado a cada energia de cada interação, e ranquear as diferentes conformações de acordo com o valor de energia obtido (VERLI, 2014; GIMENO, 2019). Existe atualmente uma variedade de funções de *scoring*, as quais podem ser escolhidas de acordo com objetivo do estudo, e se dividem em empíricas, baseada em conhecimento, baseada em campos de força e combinadas (TANCHUK, 2015; KADUKOVA, 2017).

3.4.7 Virtual Screening

Virtual screening (VS) é um método computacional de seleção de compostos com uma atividade biológica específica, que utiliza uma série de protocolos, como filtros, para encontrar os compostos com maior atividade biológica, e envolve o cálculo de afinidade e modo de ligação de diversos compostos (GIMENO, 2019). No processo de descobrimento de novos fármacos, o uso do VS é o passo anterior a etapa experimental, uma vez que os compostos após passarem pelos filtros do VS, os chamados “hits”, são sintetizados para testes experimentais para a comprovação da sua atividade biológica (JAGHOORI, 2016; TANCHUK, 2015).

Os métodos de VS podem ser divididos em métodos baseados na estrutura do ligante e baseados na estrutura do receptor (VERLI, 2014; GIMENO, 2019). O método baseado na estrutura tem o foco na afinidade dos compostos de interesse com o sítio ativo da proteína alvo. O método baseado na estrutura do ligante, por sua vez, analisa a similaridade de propriedades físico-químicas e estruturais dos compostos em investigação com os compostos ativos para a proteína alvo escolhida, baseando-se no princípio propriedade similar, proposto por Johnson e Maggiora (GIMENO, 2019).

4 METODOLOGIA

4.1 Docking Molecular

Docking molecular, também chamado de atracamento molecular ou ancoragem molecular, diz respeito a uma técnica de modelagem molecular, com o fim de investigar propriedades de um complexo proteína-ligante. Esta ferramenta faz uso das informações contidas na estrutura cristalina tridimensional de uma proteína, para prever as conformações, orientações e posições de menor energia, nas quais um substrato interage com a região do sítio ativo de uma macromolécula (BJERRUM, 2016; GIMENO, 2019; QUIROGA, 2016; PAGADALA, 2016).

Através desta técnica é possível calcular a energia livre de ligação do complexo, permitindo a predição da afinidade entre uma molécula orgânica, que atua como o substrato, e o receptor, que é comumente uma proteína. No estudo por dessa ferramenta, são levadas em consideração fatores que podem influenciar o resultado, como a solvatação, contribuições entrópicas, bem como as interações intermoleculares entre os componentes. Além disso, pode-se fazer um ranking das conformações de acordo com energia de ligação (KADUKOVA, 2017; LAPE, 2010; LE GLILLOUX, 2009; BJERRUM, 2016).

O docking molecular é constituído de dois componentes essenciais, um algoritmo de busca e uma função de scoring. O algoritmo de busca identifica as conformações do ligante, as quais possuem uma maior afinidade com o sítio ativo da proteína receptora. A função de scoring, por sua vez, tem por função quantificar o valor de energia de ligação e ordenar as conformações em função do valor de energia obtido (LAPE, 2010; TANCHUK, 2015).

Em via a sua versatilidade, o docking molecular tem se mostrado uma ferramenta útil e de fácil acesso para a investigação das interações proteína-ligante à nível molecular, e avaliação da atividade biológica de compostos orgânicos. Em razão disso, estudos por meio de docking tem-se difundido, sendo emprego em diversas linhas de pesquisa do campo da química, biologia e áreas correlatas (LAPE, 2010; VERLI, 2014).

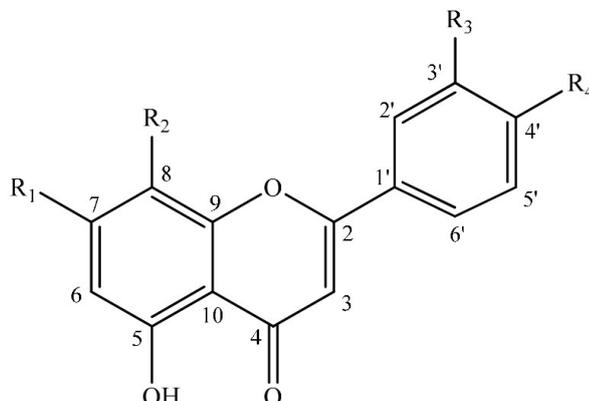
4.1.1 Obtenção das Estruturas

A etapa inicial para a realização do docking molecular, consistiu na obtenção das estruturas das proteínas, das moléculas ligantes propostas, e moléculas de referência, para comparação dos resultados. As estruturas tridimensionais cristalizadas das proteínas foram obtidas por meio do portal eletrônico RCSB Protein Data Bank .

As estruturas das moléculas ligantes propostas foram obtidas pela construção de modelos tridimensionais de cinco flavonoides sulfatados descritos por TELES, 2015, fazendo uso do software GaussView. No banco de dados BindingDB, buscando por "thrombosis"

foram encontradas uma série de ligantes e uma lista com links para páginas referentes à 74 estruturas de proteínas, no banco de dados Protein Data Bank (PDB).

Figura 6. Dímeros de Flavonoides Sulfatados baseado em éteres.



6a (Beltraonina): $R_1=OSO_3H$, $R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$.

6b (Caicoína): $R_1=OH$, $R_2=OSO_3H$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$.

6c (Pedroína): $R_1=OH$, $R_2=OSO_3H$, $R_3=OCH_3$, $R_4=OH$.

6d (Wissadulina): $R_1=OSO_3H$, $R_2=H$, $R_3=H$, $R_4=OCH_3$.

6e (Yannina): $R_1=OH$, $R_2=OSO_3H$, $R_3=H$, $R_4=OH$.

Fonte: TELES, 2015

Através da ferramenta Matchmaker, inclusa no software UCSF Chimera, foi possível comparar as estruturas das proteínas, e percebeu-se semelhanças estruturais da ordem superior a 90%, por vezes foram encontradas proteínas de estruturas idênticas. Em decorrência disso, dentre as 74 proteínas iniciais foram selecionadas 9 estruturas.

4.1.2 Preparação do Sistema

A etapa de preparação do sistema é essencial para o bom desempenho do estudo por docking molecular, e ocorre anteriormente à realização dos cálculos. A estrutura da proteína comumente vem acompanhada de um ligante co-cristalizado, normalmente no sítio ativo da proteína. Faz-se necessário, portanto, a remoção deste, para que o sítio ativo esteja disponível para o atracamento dos ligantes em estudo. Para desempenhar essa etapa do trabalho empregou-se o programa UCSF Chimera.

As estruturas das proteínas obtidas, eventualmente, podem apresentar falhas na estrutura decorrentes do procedimento experimental para a obtenção da estrutura 3D, as quais podem acarretar em interferências no desempenho do cálculo. Afim de se evitar isso, utilizou-se a ferramenta PDB2PQR, para predição do pKa dos resíduos ionizáveis das proteínas com base no pH (definido em 7), e consecutivamente eventuais correções na estrutura dos alvos.

Na estrutura da proteína obtida, são encontrados também, moléculas explícitas de água, principalmente no sítio ativo das estruturas, usualmente chamadas de água de cristalização. Existe uma discussão no campo da modelagem molecular acerca de manter ou não as ditas águas de cristalização durante o estudo por docking molecular.

De acordo com FREY 1994, as moléculas de águas devem ser consideradas como parte fundamental da proteína, uma vez que estas desempenham um papel essencial em suas propriedades estruturais, catalíticas, dinâmicas e termodinâmicas. Além disso, contribuem para uma menor energia de ligação entre uma proteína e um substrato, uma vez que essas moléculas de água são facilmente deslocadas.

Para fins de comparação e análise, nesse estudo, foram preparados duas baterias de *docking* distintas, nas quais, em uma delas as águas de cristalização foram removidas, utilizando o programa UCSF Chimera, enquanto em outra, as águas de cristalização foram mantidas. Afim de que se conheça o método mais adequado de se tratar tais estruturas.

À posteriori, fez-se necessário definir a região da proteína na qual a molécula ligante deve interagir, onde os cálculos de interação proteína-ligante são realizados. Essa etapa foi realizada utilizando-se o programa Autodock Tools, no qual, as coordenadas do sítio ativo da proteína, região da proteína onde as interações a serem calculadas, é definida por um cubo ajustável, chamado Gridbox. Após isso, através do mesmo programa, foi possível gerar um arquivo com extensão “pdbqt” da estrutura da proteína e dos ligantes, para a etapa fundamental posterior e execução dos cálculos.

Uma importante etapa do trabalho consiste em procurar a estrutura tridimensional mais estável energeticamente, através da otimização da geometria dos ligantes, tanto os ligantes propostos, quanto os ligantes de referência. Para a realização desta etapa faz-se o uso do programa XTB.

Para a otimização de estrutura dos ligantes em estudo, foi empregado um método semi empírico XTB, próprio do programa de mesmo nome. Este procedimento é relativamente simples e não requer um alto poder computacional. Por fim, de forma semelhante à proteína, gerou-se um arquivo com extensão “pdbqt” da estrutura do ligante.

4.1.3 Execução dos Cálculos

A execução dos cálculos de docking molecular foram realizados por meio do programa SMINA. A função “exhaustiveness”, que se refere a quantas vezes a interação proteína-ligante deve ser calculada, foi ajustada para 30. Para fins de comparação de

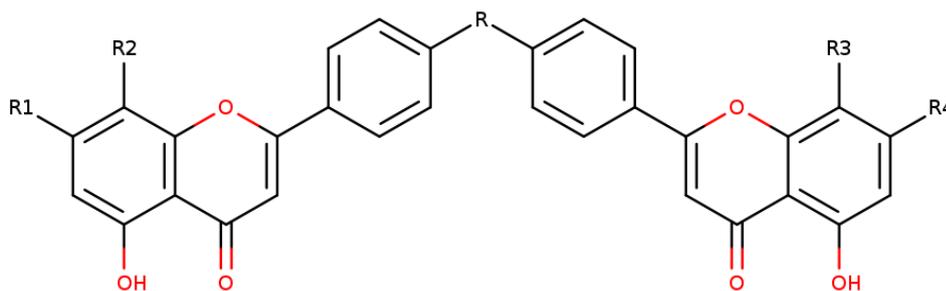
resultados, foram utilizadas duas funções de scoring distintas, Vinardo (QUIROGA, 2016) e Dkoes (KOES, 2013).

Na primeira bateria de simulações por docking molecular, comparou-se o desempenho dos cinco flavonoides sulfatados propostos, frente a 20 moléculas obtidas no BindingDB, selecionadas pelo critério de menor energia de ligação, informação fornecida pelo banco de dados. Dentre as 73 proteínas dispostas no BindingDB, 20 foram utilizadas neste ensaio, sendo aplicada apenas uma função de scoring, Dkoes, e o tamanho da caixa de simulação (gridbox), que seleciona a região da proteína onde os cálculos são realizados foi configurado em 50 Å³.

Após a realização da primeira bateria de docking, foi proposta uma alteração na estrutura das moléculas em estudo, decidiu-se utilizar dímeros baseado em éteres dos flavonoides previamente descritos, aqui chamados de Dibeltroanina, Dicaicoína, Dipedroína, Diwissadulina e Diyannina.

A escolha da função éter se baseia na proposta de uma oxidação dos grupos OH presentes na posição 2 do anel C dos flavonoides de origem, publicados por TELES, 2015. Nota-se que na Dipedroína, diferente das demais estruturas, a esterificação ocorre na posição 3 do anel C invés da posição 2. A escolha é justificada pela tentativa de se evitar um impedimento estérico, o que também justifica o prolongamento da cadeia. As estruturas estão representadas nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Dímeros de Flavonoides Sulfatados baseado em éteres.



2a (Dibeltraonina): R=OCH₂O, R1=OSO₃, R2=OH, R3=OH, R4=OSO₃.

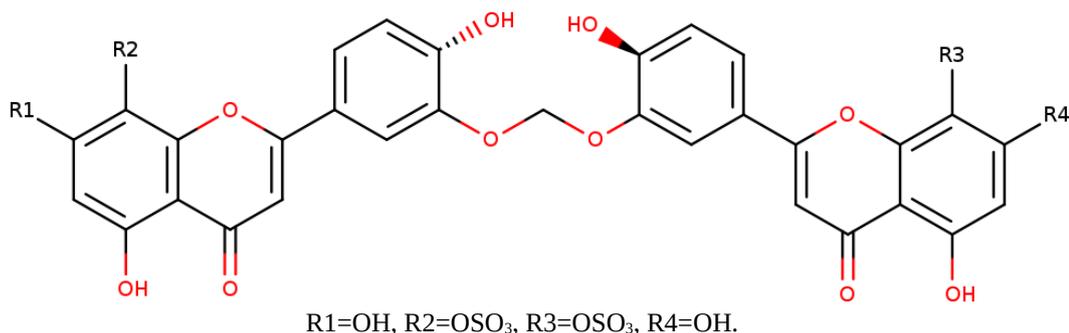
2b (Dicaicoína): R=OCH₂O, R1=OH, R2=OSO₃, R3=OSO₃, R4=OH.

2c (Diwissadulina): R=OCH₂O, R1=OSO₃, R2=H, R3=H, R4=OSO₃.

2d (Diyannina): R=O, R1=OH, R2=OSO₃, R3=OSO₃, R4=OH.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8. Dipedroina.



Fonte: Elaborado pelo autor

Para a avaliação do desempenho dos dímeros, realizou-se uma segunda bateria de docking, comparando o desempenho do novo conjunto de ligantes frente a molécula de referência de melhor desempenho no ensaio anterior, BDBM289853. Foram utilizadas 5 proteínas dentre as 20 anteriores anteriormente avaliadas.

Este ensaio foi realizado em duas etapas, na primeira etapa o gridbox foi configurado em 50 Å³, e em uma segunda etapa, os cálculos foram refeitos configurando o gridbox em 30 Å³. Em ambas as etapas, foram aplicadas duas funções de scoring, Dkoes e Vinardo

Por fim, foi realizado um terceiro ensaio de docking, para validar o desempenho dos dímeros dos flavonoides frente às moléculas concorrentes. Para isso, foram avaliados no estudo de docking o desempenho dos cinco dímeros frente às cinco moléculas concorrentes que obtiveram a menor energia de ligação na primeira bateria de docking.

Dentre as 73 proteínas, dispostas no BindingDB, 9 foram selecionadas, sob o critério de similaridade estrutural. Semelhante ao ensaio anterior, este também foi realizado em duas etapas, uma etapa na qual manteve-se as águas de cristalização na estrutura das proteínas, e uma segunda etapa onde as águas de cristalização foram removidas.

No ensaio anterior, percebeu-se o melhor desempenho da função de scoring Vinardo em relação à Dkoes, em função disso, nesse ensaio aplicou-se apenas a Vinardo. Percebeu-se também no ensaio anterior, um resultado mais promissor quando o gridbox foi configurado em 30 Å³, portanto assim se manteve.

Após a execução dos cálculos, fez-se necessário o uso de programas que permitam visualizar as conformações geradas, e as interações dessas conformações com o as cadeias laterais presentes no sítio ativo da proteína. Para este fim, fez-se o uso do programa Pymol, a partir do qual é possível fazer o tratamento dos dados obtidos por meio do *docking*, além de avaliar a conformação de menor energia gerada e se esta ligou-se na região do sítio ativo.

4.2 Validação do Método

A simulação por *docking* molecular é uma técnica que se demonstra muito prática e eficaz. Contudo, a validade dos resultados obtidos através do mesmo requer uma comprovação da confiabilidade do método. A eficácia do método pode ser demonstrada por meio do RMSD, do inglês *root mean square deviation*, ou simplesmente, desvio quadrático médio.

$$\text{RMSD}(x,y) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^n \|x_i - y_i\|^2} \quad (2)$$

Em que x e y dizem respeito respectivamente às posições da estrutura em análise e da estrutura de referência, enquanto N é o número de pares de átomos correspondentes. Válido ressaltar que $x_i - y_i$ fornece a distância entre átomos correspondentes de cada estrutura.

O RMSD pode ser compreendido, no contexto do presente trabalho, como uma medida de similaridade entre duas estruturas. O seu uso permite quantificar a diferença conformacional entre o ligante nativo e as diversas posições geradas no *docking* molecular, afim de que se determine o quão diferentes as conformações obtidas estão do ligante nativo. Eventualmente, pode-se determinar também quais dentre as conformações geradas estão mais próximas do ligante nativo (SARGSYAN, 2017).

Para a execução dessa etapa se fez uso do *fconv*, um programa que visa a manipulação e análise de propriedades das moléculas em estudo. O *fconv* é uma ferramenta computacional que desempenha uma série de funções associadas ao processo de desenvolvimento de fármacos, dentre elas, o cálculo do RMSD.

4.3 Redocking

Visando a validação dos resultados obtidos no terceiro ensaio de simulações por *Docking* Molecular, foi realizado um ensaio de *redocking*, que consiste em recalcular as energias de ligação partindo da conformação resultante de uma simulação prévia de *docking*. Para certificar-se que os resultados anteriores não dependem do método, o *redocking* foi realizado por meio de um programa diferente, SwissDock.

O SwissDock, é servidor online dedicado à simulação de docking molecular para sistemas proteína-ligante. Visto que se trata de uma ferramenta online, não se faz necessário a instalação local do programa, uma vez que este permite o envio das estruturas envolvidas na simulação e o download dos resultados, posteriormente.

O SwissDock é uma ferramenta online baseada no programa de docking molecular EADock DSS, e utiliza-se de uma função de scoring baseada em parâmetros gerados pelo campo de força CHARMM. Estudos prévios certificam que o SwissDock possui performance similar a outros programas de docking, como AutoDock, Autodock Vina e Molegro Virtual Docker (AZEVEDO JR, 2019).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Primeiro Ensaio de Docking

A primeira bateria de simulações de *docking* molecular avaliou o desempenho do grupo de flavonoides sulfatados em estudo frente a 20 moléculas obtidas no BindingDB. Para isso foram selecionadas 20 proteínas associadas ao fator de coagulação IX, obtidas no PDB. A simulação deu-se por meio do programa SMINA, fazendo-se uso da função de scoring Dkoes, e os resultados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores de energia livre de ligação (Kcal/mol) obtidos no primeiro ensaio de Docking

Ligante	1XX9	1ZHM	1ZHP	1ZHR	1ZLR	1ZMJ	1ZML	1ZMN	1ZOM	1ZPB	1ZPC	1ZPZ	1ZRK	1ZSJ	1ZSK	1ZSL	1ZTJ	1ZTK	1ZTL	2FDA
Beltraonin	-6.8 [†]	-7.0 [†]	-6.8	-6.9	-7.0	-7.0	-7.4	-7.0	-6.7	-6.9	-7.1	-6.9	-6.6	-6.8	-7.0	-6.8	-6.7	-6.6	-6.9	-6.9
Caicoïn	-6.1	-6.9	-7.1	-7.1	-6.7	-7.1	-6.7	-7.6 [†]	-6.8	-7.2	-7.2 [†]	-6.9	-6.7	-7.1 [†]	-7.1	-6.9	-7.2 [†]	-7.2	-6.8	-6.8
Pedroïn	-6.3	-6.9	-7.2 [†]	-6.8	-7.2 [†]	-7.1	-7.0	-7.6 [†]	-7.1 [†]	-7.3 [†]	-7.2 [†]	-7.3 [†]	-6.9 [†]	-7.1 [†]	-7.2 [†]	-7.1	-6.9	-6.9	-6.9	-6.9
Wissadulin	-6.6	-6.8	-6.9	-6.7	-7.0	-6.8	-7.2	-6.9	-6.8	-7.0	-7.1	-6.8	-6.8	-6.6	-6.8	-7.3	-6.6	-6.5	-6.6	-6.6
Yannin	-6.3	-6.7	-6.9	-7.8 [†]	-6.8	-7.2 [†]	-7.6 [†]	-7.6 [†]	-7.0	-7.3 [†]	-7.1	-7.0	-6.8	-6.9	-7.1	-7.4 [†]	-6.8	-7.6 [†]	-7.2 [†]	-7.2 [†]
BDBM289787	-7.8	-8.1	-8.3	-7.2	-7.8	-8.4	-8.6	-8.5	-8.6	-8.6	-9.2	-8.5	-8.3	-7.7	-8.3	-9.3	-7.9	-8.4	-7.8	-7.8
BDBM289794	-6.9	-7.4	-7.8	-8.0	-7.9	-7.6	-7.9	-7.4	-7.9	-8.1	-8.6	-8.2	-8.1	-8.0	-8.2	-8.5	-8.2	-8.4	-7.6	-7.6
BDBM289795	-6.6	-8.2	-7.4	-8.5	-7.8	-7.5	-8.0	-7.8	-8.1	-8.5	-8.3	-8.3	-7.8	-7.8	-6.7	-7.7	-8.4	-8.0	-7.2	-7.2
BDBM289796	-7.6	-8.2	-8.3	-8.1	-9.0	-8.2	-9.0	-8.3	-9.0	-9.3	-9.1	-9.1	-9.1	-8.2	-8.5	-9.6 [‡]	-8.2	-7.7	-8.3	-8.3
BDBM289797	-7.2	-7.0	-8.0	-8.1	-7.7	-7.5	-8.5	-7.5	-8.0	-8.0	-8.3	-7.5	-7.7	-8.0	-7.2	-8.2	-8.0	-7.7	-8.0	-8.0
BDBM289798	-6.8	-7.6	-7.6	-7.6	-7.8	-8.3	-7.4	-7.7	-7.8	-7.8	-8.2	-7.9	-7.9	-7.0	-7.3	-7.8	-7.8	-7.5	-7.3	-7.3
BDBM289799	-7.9	-7.7	-8.2	-8.7	-8.3	-8.1	-8.6	-8.1	-9.2	-8.4	-8.7	-9.0	-8.2	-8.1	-8.7	-8.5	-8.4	-8.4	-8.6	-8.6
BDBM289800	-7.8	-8.3 [‡]	-7.7	-7.7	-8.3	-8.1	-8.4	-8.4	-8.6	-8.6	-8.4	-8.8	-8.1	-8.0	-8.1	-8.9	-7.9	-7.8	-7.9	-7.9
BDBM289801	-7.9	-8.2	-7.7	-7.7	-8.0	-8.5	-8.1	-8.0	-8.2	-8.6	-8.4	-8.9	-8.5	-8.0	-8.0	-8.8	-8.0	-8.3	-7.7	-7.7
BDBM289803	-7.8	-8.3 [‡]	-8.1	-9.7 [‡]	-8.2	-8.9	-8.4	-8.9 [‡]	-9.1	-8.6	-8.7	-8.4	-8.6	-8.1	-8.6	-8.6	-8.2	-8.5	-8.4	-8.4
BDBM289804	-7.1	-8.1	-8.1	-7.7	-7.7	-8.2	-7.5	-7.6	-7.4	-7.4	-8.7	-8.0	-8.0	-7.0	-7.9	-8.6	-7.7	-7.7	-7.7	-7.7
BDBM289805	-7.2	-7.8	-8.1	-7.4	-7.7	-7.7	-8.1	-7.4	-8.5	-8.2	-8.1	-7.9	-8.6	-7.3	-8.1	-8.1	-8.0	-8.3	-7.7	-7.7
BDBM289807	-7.2	-8.1	-7.8	-7.8	-7.5	-7.8	-7.6	-7.9	-8.1	-8.4	-7.9	-8.1	-8.3	-7.9	-8.4	-7.6	-7.6	-7.8	-8.3	-8.3
BDBM289811	-6.9	-7.7	-7.8	-7.9	-8.0	-7.2	-8.1	-7.3	-7.8	-7.9	-8.2	-7.6	-7.6	-7.1	-7.6	-8.1	-7.8	-7.9	-7.5	-7.5
BDBM289816	-7.7	-8.1	-8.0	-8.1	-8.5	-8.5	-8.4	-8.1	-8.3	-8.2	-9.1	-8.6	-9.3 [‡]	-7.9	-8.3	-8.4	-8.4	-8.4	-7.9	-7.9
BDBM289844	-8.0	-7.9	-8.3	-8.5	-8.9	-9.1	-8.5	-8.6	-9.3 [‡]	-8.7	-9.1	-8.5	-8.9	-8.7	-8.6	-8.8	-9.0	-8.8	-8.3	-8.3
BDBM289848	-8.0	-8.2	-8.8	-8.2	-8.6	-8.3	-8.5	-8.7	-8.5	-8.6	-8.6	-9.2	-8.7	-9.0	-9.1	-9.1	-9.0	-9.1	-8.8	-8.8
BDBM289849	-8.3	-7.9	-8.7	-8.0	-9.1	-8.9	-9.2	-8.6	-8.2	-9.1	-9.3	-9.2	-9.0	-8.3	-8.6	-8.8	-9.6 [‡]	-8.6	-8.9 [‡]	-8.9 [‡]
BDBM289851	-7.2	-7.7	-8.2	-7.2	-8.0	-9.0	-8.6	-7.5	-8.0	-8.0	-8.5	-8.3	-7.9	-8.3	-7.7	-8.1	-8.1	-8.0	-7.5	-7.5
BDBM289853	-8.7 [‡]	-8.1	-9.3 [‡]	-8.3	-9.7 [‡]	-10.7 [‡]	-9.7 [‡]	-8.9 [‡]	-9.3 [‡]	-9.4 [‡]	-9.4 [‡]	-9.3 [‡]	-9.0	-9.3 [‡]	-9.2 [‡]	-9.5	-9.2	-9.3 [‡]	-8.8	-8.8

†. Menores valores de energia de ligação dentre os ligantes em estudo; ‡. Menores valores de energia de ligação dentre os ligantes de referência

Fonte: Elaborada pelo autor

Estão dispostos nas colunas os resultados do cálculo da energia de ligação, expressos em Kcal/mol, para cada uma das 20 proteínas selecionadas, obtidos através da simulação de docking molecular.

É notável que nesse ensaio, os ligantes de referência apresentam certa vantagem em relação aos ligantes propostos. Em todos os alvos, o menores valores de energia de ligação são encontrados com as moléculas concorrentes. A diferença de energia entre os melhores resultados dentre os ligantes propostos e os ligantes de referência oscilam entre 1,3 Kcal/mol (1ZHM) e 3,5 Kcal/mol (1ZMJ).

Ainda acerca da Tabela 1, é possível observar que dentre as 20 moléculas concorrentes avaliadas no estudo, apenas 7 apresentaram mínimo local de energia de alguma proteína. Dentre as quais, 4 apresentaram mínimo de energia para um alvo (BDBM289796, BDBM289800, BDBM289816 e BDBM289844), duas apresentaram mínimos de energia para três alvos (BDBM289803 e BDBM289849) e uma molécula, BDBM289853, obteve grande destaque, sendo a molécula com maior eficiência em 12 dentre os 20 alvos testados.

5.2 Segundo Ensaio de Docking

Os resultados obtidos na primeira bateria de docking foram muito abaixo do esperado, e em razão disso, elaborou-se uma nova estratégia na intenção de superar os obstáculos. Optou-se então por fazer alterações estruturais na estrutura dos ligantes. A proposta consistiu em construir dímeros baseado em éteres dos flavonoides sulfatados previamente estudados, renomeando as moléculas para Dibeltroanina, Dicaicoína, Dipedroína, Diwissadulina e Diyannina.

Visto que se tratava um sistema muito diferente do proposto inicialmente, foi realizado uma nova bateria de simulações por docking molecular, a caráter de teste, no intuito de ter-se uma breve avaliação desempenho dos novos ligantes propostos. O desempenho dos novos ligantes foi avaliado frente a molécula de melhor desempenho dentre as concorrentes no ensaio anterior, aqui referida como BDBM289853.

Neste ensaio, foram utilizadas apenas 5 dentre as 20 proteínas anteriores, o gridbox foi configurado em 50 Å³, e diferentemente do ensaio anterior, neste foram aplicadas duas funções de scoring, Dkoes e Vinardo, para fins de comparação de desempenho. Os valores de energia de ligação obtidos estão dispostos nas Tabela 2 e 3.

Tabela 2. Valores de energia livre de ligação (Kcal/mol) utilizando função de scoring Dkoes, gridbox de 50Å³

Ligante	1ZHP	1ZMJ	1ZPB	1ZSJ	1ZTK
Dibeltraonina	-9,5 [†]	-9,4	-10,0 [†]	-9,0	-8,8
Dicaicoina	-8,9	-8,7	-8,6	-9,7	-8,3
Dipedroina	-8,2	-9,5	-9,5	-10,1 [†]	-9,1
Diwissadulina	-9,3	-9,4	-9,1	-9,2	-8,6
Diyannina	-8,2	-9,2	-8,8	-9,3	-8,2
BDBM289853	-9,4	-10,4 [†]	-10,0 [†]	-9,0	-9,3 [†]

†. Menor valor de energia de ligação obtido

Fonte: Elaborada pelo autor

Encontram-se na Tabela 2, as energias de ligação obtidos através do *docking*, fazendo-se uso da função de *scoring* Dkoes. Aqui, nota-se um resultado mais promissor em relação ao ensaio anterior, visto que para o alvo 1ZPB, obteve-se o mesmo valor de afinidade (-10,0 Kcal/mol), enquanto para os alvos 1ZHP e 1ZSJ, a afinidade superou o ligante com uma margem de 0,5 kcal/mol.

No entanto, ainda é observado uma maior afinidade do ligante concorrente. Para o alvo 1ZMJ, o ligante abre uma vantagem de 0,9 Kcal sobre a Dipetroina, na qual se observa a maior afinidade dentre os ligantes propostos para este alvo. Em relação ao alvo 1ZTK, por sua vez, a maior afinidade dentre as moléculas propostas é encontrada na Dipetroina, a 0,2 Kcal/mol da BDBM289853, qual obteve o melhor resultado para este alvo.

Tabela 3. Valores de energia livre de ligação (Kcal/mol) utilizando função de scoring Vinardo, gridbox de 50Å³

Ligantes	1ZHP	1ZMJ	1ZPB	1ZSJ	1ZTK
Dibeltraonina	-10,4 [†]	-11,6 [†]	-12,3 [†]	-12,1 [†]	-10,3
Dicaicoina	-10,3	-10,5	-10,6	-11,3	-11,6 [†]
Dipedroina	-8,5	-9,0	-9,6	-8,5	-9,5
Diwissadulina	-8,8	-11,2	-12,3 [†]	-11,0	-11,0
Diyannina	-9,9	-11,1	-10,8	-10,8	-10,7
BDBM289853	-8,6	-8,5	-9,1	-8,8	-8,9

†. Menor valor de energia de ligação obtido

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores dispostos na Tabela 3 foram obtidos aplicando-se uma função de scoring diferente, Vinardo. A melhora dos resultados em relação aos obtidos com a função de scoring anterior é considerável. Aqui, percebe-se que, para os todos os alvos aqui analisados, o menor valor de energia de ligação foi encontrado em uma das moléculas propostas. Com destaque para a Dibeltraonina, que obteve o melhor valor de afinidade em 4 dos 5 alvos estudados.

As maiores vantagens de afinidade em relação a molécula concorrente foram obtidas para os alvos 1ZSJ, onde a Dibeltraonina apresenta uma vantagem de 3,3 Kcal/mol, e

1ZPB, onde Dibeltraonina e Diwissadulina partilham o mesmo valor de afinidade, o qual possui uma vantagem de 3,2 Kcal/mol.

Em seguida, igualmente para fins de comparação e análise, a bateria de docking foi refeita, ainda utilizando-se das duas funções de scoring previamente mencionadas, contudo, o gridbox fora reajustado para 30 Å³. Encontram-se nas Tabela 2 e 3, os valores de energia de ligação obtidos.

Tabela 4. Valores de energia livre de ligação (Kcal/mol) utilizando função de scoring Dkoes, gridbox de 30Å³

Ligantes	1ZHP	1ZMJ	1ZPB	1ZSJ	1ZTK
Dibeltraonina	-7,7	-9,4	-9,3	-9,1	-9,2 [†]
Dicaicoína	-8,8	-9,1	-8,7	-9,7	-8,6
Dipedroína	-7,8	-8,8	-9,7	-10,1 [†]	-9,1
Diwissadulina	-8,0	-9,3	-9,0	-8,5	-8,9
Diyannina	-8,3	-9,4	-8,9	-9,2	-8,2
BDBM289853	-9,3 [†]	-10,5 [†]	-9,8 [†]	-9,6	-9,2 [†]

[†]. Menor valor de energia de ligação obtido

Fonte: Elaborada pelo autor

Dispõem-se na Tabela 4, as energias de ligação obtidos através do docking, fazendo-se uso da função de scoring Dkoes. Aqui, percebe-se um desempenho sutilmente inferior comparado ao ensaio em que se usou a mesma função de scoring, porém com um gridbox com dimensões maiores.

Para os alvos 1ZHP, 1ZMJ e 1ZPB pode ser observada uma vantagem energética de 1,6 kcal/mol, 1,1 kcal/mol e 0,1 kcal/mol, respectivamente, em relação às moléculas de melhor desempenho dentre os ligantes propostos. Todavia, para o alvo 1ZTK, encontrou-se na Dipedroína o mesmo valor de afinidade que o ligante de referência (9,2 Kcal/mol), enquanto para o alvo 1ZSJ, a afinidade superou o ligante concorrente com uma margem de 0,5 kcal/mol.

Tabela 5. Valores de energia livre de ligação (Kcal/mol) utilizando função de scoring Vinardo, gridbox de 30Å³

Ligantes	1ZHP	1ZMJ	1ZPB	1ZSJ	1ZTK
Dibeltraonina	-10,4 [†]	-11,7 [†]	-12,5 [†]	-12,2 [†]	-10,2
Dicaicoína	-9,9	-11,6	-10,7	-11,6	-11,7 [†]
Dipedroína	-8,7	-8,9	-8,8	-8,6	-9,5
Diwissadulina	-8,5	-11,4	-12,1	-9,5	-10,1
Diyannina	-9,8	-10,7	-10,6	-11	-10,3
BDBM289853	-8,8	-8,4	-10,5	-8,7	-8,9

[†]. Menor valor de energia de ligação obtido

Fonte: Elaborada pelo autor

Aplicando a função de scoring Vinardo, foram obtidas as energias de ligação dispostas na Tabela 5. Comparando com o ensaio anterior no qual também fora utilizado a Vinardo, nota-se que os resultados foram muito semelhantes, com sutis variações.

De forma semelhante ao ensaio anterior, nesse estudo, também conferiu-se destaque para a Dibeltraonina, a qual novamente, apresentou a maior afinidade com o sítio ativo para 4 dentre as 5 proteínas estudadas. Com destaque para os alvos 1ZSJ, no qual a Dibeltraonina apresentou uma vantagem de 3,5 Kcal/mol em relação à molécula concorrente, e 1ZMJ, no qual a diferença de energia em relação ao ligante referência é de 3,3 Kcal/mol.

Com base nos resultados apresentados, pode-se observar resultados mais promissores quando aplicado o Vinardo como função de scoring, ao invés do Dkoes. Isso ocorre em função de que o Vinardo possui parâmetros que descrevem de forma mais satisfatória o sistema em estudo. Além disso, comparando-se os ensaios no quais são usados o Vinardo, é possível notar uma discreta vantagem quando o gridbox foi configurado em 30 Å³.

5.3 Terceiro Ensaio de Docking

Os ensaios anteriores foram promissores e em razão disso decidiu-se realizar uma terceira leva de simulações, afim de validar os resultados obtidos com o novo conjunto de ligantes, avaliando o desempenho destes frente a 5 moléculas concorrentes com o melhor desempenho na primeira bateria de testes. Para este ensaio, foi adotado um novo critério de seleção dos alvos, dentre os 73 alvos iniciais propostos pelo BindingDB, apenas 9 foram utilizados neste ensaio, selecionados sob o critério de similaridade estrutural.

Em decorrência da análise do ensaio prévio a este, optou-se por aplicar apenas uma função de scoring, Vinardo, e o gridbox, foi configurado em 30 Å³. Esta bateria de cálculos foi realizada em duas etapas, uma na qual as águas de cristalização foram mantidas, e outra na qual essas estruturas foram removidas antes da simulação.

Tabela 6. Valores de energia livre de ligação removendo-se as águas de cristalização

Ligantes	2FDA	3SOR	4CR9	4X6P	5QOD	6HHC	6TWC	6USY	6W50
Dibeltraonina	-11,8	-10,4	-9,0	-12,3 [†]	-11,1	-11,4 [†]	-9,8	-12,1 [†]	-11,8
Dicaicoína	-11,8	-11,3 [†]	-9,8	-10,5	-11,2 [†]	-9,8	-11,1 [†]	-11,5	-10,9
Dipedroína	-8,4	-9,2	-9,2	-8,9	-8,5	-8,0	-9,7	-10,5	-11,1
Diwissadulina	-11,9	-10,3	-9,9 [†]	-12,1	-10,5	-9,6	-10,6	-11,2	-8,8
Diyannina	-12,3 [†]	-11,0	-9,9 [†]	-10,4	-10,7	-9,6	-10,1	-11,1	-11,0
BDBM289796	-9,1	-8,1	-8,0	-7,9	-9,4	-8,1	-8,2	-8,0	-9,1
BDBM289803	-10,3	-9,3	-9,1	-8,5	-9,7	-8,4	-8,7	-9,1	-8,1
BDBM289844	-8,7	-9,1	-8,6	-9,4	-9,8	-8,9	-9,2	-9,4	-9,6
BDBM289849	-9,5	-8,2	-8,4	-8,8	-9,1	-8,2	-8,7	-8,5	-8,5
BDBM289853	-11,9	-9,5	-10,3 [‡]	-9,0	-8,8	-9,5	-10,1	-10,1	-9,4

†. Menores valores de energia de ligação dentre os ligantes em estudo; ‡. Menores valores de energia de ligação dentre os ligantes concorrentes

Fonte: Elaborada pelo autor

Encontram-se na Tabela 6, os valores das energias de ligação computados no ensaio no qual as águas de cristalização foram removidas. Tal como esperado, os valores obtidos são promissores, em 8 dentre as 9 proteínas selecionadas o menor valor de energia de ligação foi encontrado para em uma das moléculas propostas.

Destaca-se os desempenhos obtidos com a Dibeltraonina e Dicaicoína, as quais apresentaram a maior afinidade para três alvo cada. Apenas para o alvo 4CR9 o conjunto de ligantes em análise foi superado, observando-se com uma margem de apenas 0,4 Kcal/mol.

Tabela 7. Valores de energia livre de ligação mantendo-se as águas de cristalização

Ligantes	2FDA	3SOR	4CR9	4X6P	5QOD	6HHC	6TWC	6USY	6W50
Dibeltraonina	-12,3 [†]	-11,7	-10,3	-11,5	-12,8 [†]	-10,1 [†]	-11,3 [†]	-11,4	-11,9 [†]
Dicaicoína	-11,4	-12,0 [†]	-9,9	-12,1 [†]	-12,3	-9,6	-11,0	-11,2	-10,8
Dipedroína	-9,2	-9,9	-9,4	-10,3	-8,4	-9,3	-10,9	-12,4 [†]	-8,2
Diwissadulina	-12,0	-9,6	-10,3	-8,4	-12,0	-9,9	-10,6	-10,5	-10,9
Diyannina	-11,7	-11,5	-10,4 [†]	-11,3	-11,4	-9,6	-10,2	-11,1	-9,9
BDBM289796	-9,5	-7,6	-6,1	-8,7	-8,4	-8,8	-8,2	-7,2	-8,5
BDBM289803	-7,9	-8,2	-6,2	-10,7 [‡]	-6,5	-8,5	-8,7	-8,6	-8,5
BDBM289844	-9,2	-8,7	-8,4	-9,8	-8,7	-8,9	-9,0	-8,1	-9,7 [‡]
BDBM289849	-8,6	-8,9	-8,3	-8,3	-9,2 [‡]	-9,0	-8,6	-7,6	-8,9
BDBM289853	-10,1 [‡]	-10,2 [‡]	-9,0 [‡]	-8,0	-8,7	-9,1 [‡]	-10,2 [‡]	-8,9 [‡]	-8,7

†. Menores valores de energia de ligação dentre os ligantes em estudo; ‡. Menores valores de energia de ligação dentre os ligantes concorrentes

Fonte: Elaborada pelo autor

Conforme observa-se na Tabela 7, o desempenho do conjunto de ligantes foi ainda mais promissor mantendo-se as moléculas de água na estrutura da proteína. Estes resultados concordam com FREY 1994 que defende que as águas de cristalização desempenham um papel essencial em suas propriedades termodinâmicas, estruturais, e catalíticas, visto que nesse caso, a presença dessas estruturas foram responsáveis por um decréscimo na energia de ligação.

Neste ensaio, para todas as proteínas estudadas, o menor valor de energia de ligação foi obtido por uma das moléculas em estudo. Com destaque para a Dibeltraonina que mostrou

ter a maior afinidade para 5 dentre as 9 proteínas estudadas. Dentre as moléculas de referência, o ligante BDBM289853 apresentou o melhor desempenho, obtendo a maior afinidade para 6 dentre os 9 alvos.

A diferença de energia entre o ligante em estudo com a maior afinidade, e o ligante de referência com melhor desempenho, foi mais proeminente nos alvos 5Q0D, no qual a Dibeltraonina abriu uma vantagem de 3,6 Kcal/mol sobre a BDBM289853, e para o alvo 6USY, no qual a Dipedroina apresenta uma vantagem de 3,5 Kcal/mol, também sobre a BDBM289853.

5.4 Validação do Método

O ensaio anterior se mostrou eficiente, contudo, para que os valores obtidos sejam válidos, se fez necessário a comprovação da confiabilidade do método. A confiabilidade dos métodos foi demonstrada calculando-se o desvio quadrático médio (RMSD), conforme a equação (2), fazendo uso do programa fconv. A validação se fez em duas etapas, na primeira, calculou-se o RMSD dos ligantes co-cristalizado (LCC) e na segunda etapa, o mesmo procedeu com o ligante proposto.

Para que se completasse a primeira etapa, foi realizado previamente um ensaio de docking molecular com os LCC, obtidos junto à estrutura cristalizada da proteína no PDB. Após isso, foi calculado o RMSD da conformação de menor energia resultante do docking, tomando por referência o LCC nativo.

A segunda etapa se deu de forma muito semelhante, contudo, considerando-se os ligantes de menor energia, referente ao terceiro ensaio de docking. Para cada alvo, foi calculado RMSD da conformação de menor energia, tomando por referência a estrutura nativa do mesmo. Os valores de RMSD obtidos estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores do RMSD para validação do método.

Alvo	RMSD _{LCC}	RMSD _{Ligante Proposto}	Ligante Proposto
2fda	1.330070	0.586435	Dibeltraonina
3sor	0.908301	0.133720	Dicaicoína
4cr9	0.000522	0.099247	Diyannina
4x6p	0.629404	0.142919	Dicaicoína
5q0d	0.614188	0.631786	Dibeltraonina
6hhc	0.000390	0.559794	Dibeltraonina
6twc	0.093592	0.590924	Dibeltraonina
6usy	0.146505	0.231998	Dipedroina
6w50	0.067170	0.585795	Dibeltraonina

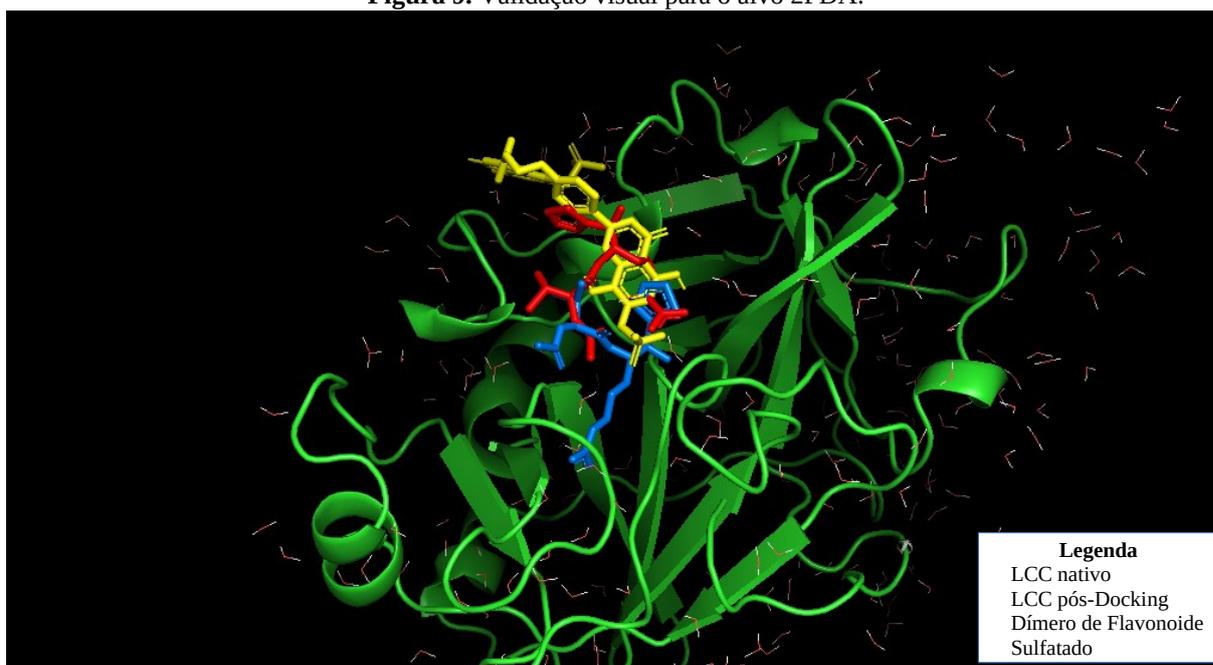
Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores de RMSD obtidos, conforme observado na Tabela 8, corroboram para a confiabilidade do método, uma vez que os valores se aproximam de zero, indicando uma alta similaridade das estruturas comparadas.

O RMSD se mostrou satisfatório como uma validação numérica, contudo, além disso, foi realizada também uma validação visual. Para isso foi empregados o Pymol, programa que permite a visualização dos resultados.

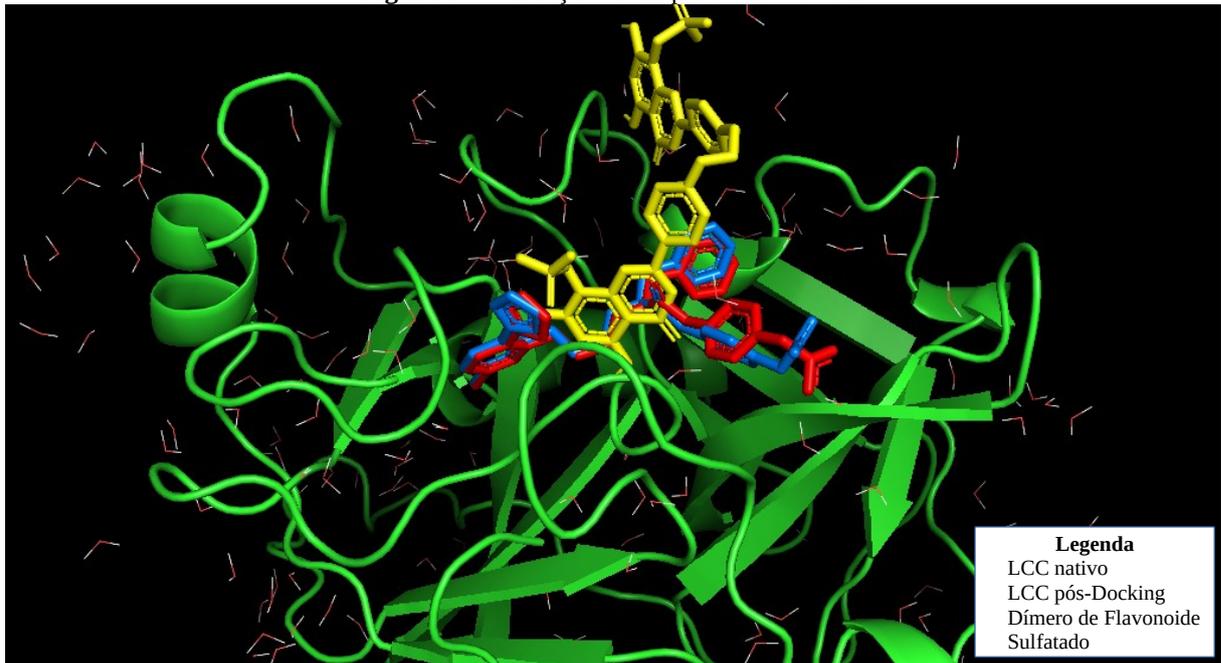
Nas Figuras 3-11, estão destacados em azul o LCC nativo, em vermelho a conformação de menor energia do LCC, obtida pelo docking molecular, e em amarelo, a conformação de menor energia do dímero de flavonoide sulfatado, obtido na terceira bateria de docking.

Figura 9. Validação visual para o alvo 2FDA.



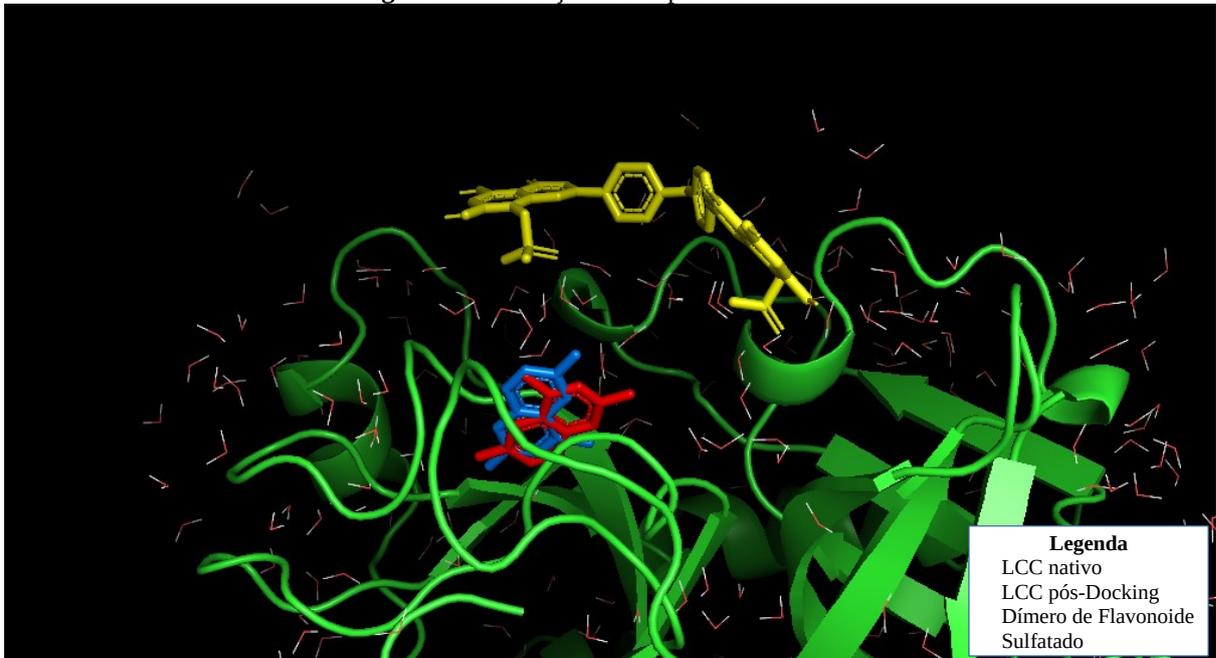
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10. Validação visual para o alvo 3SOR.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11. Validação visual para o alvo 4CR9.



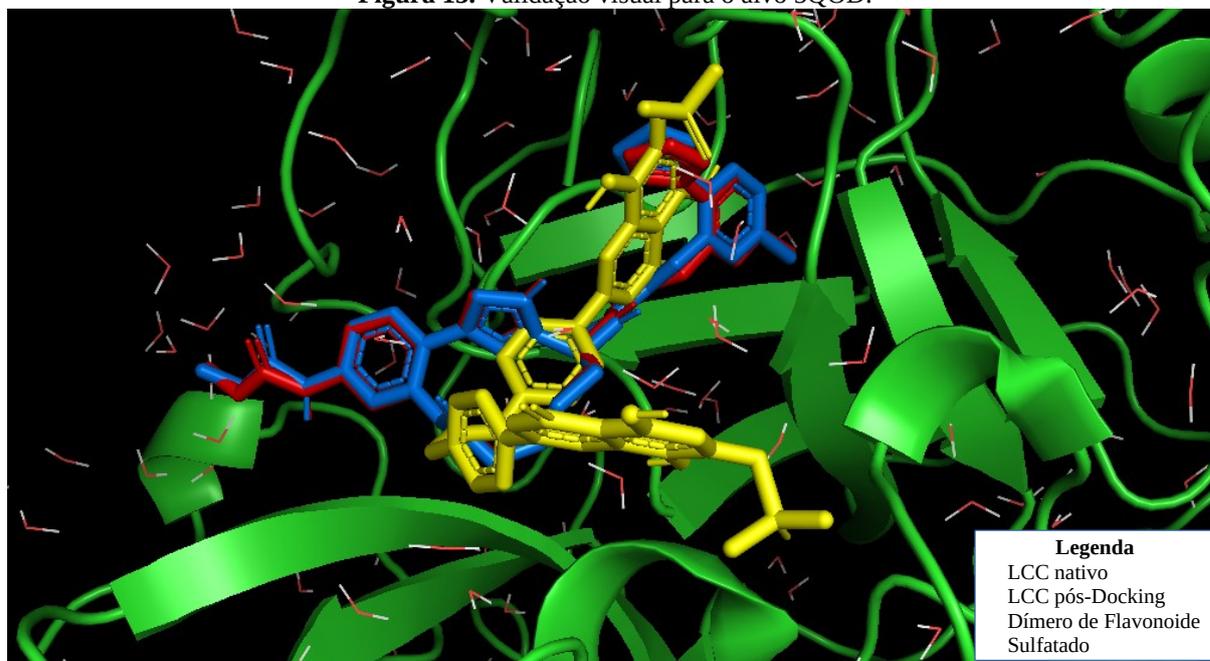
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12. Validação visual para o alvo 4X6P.



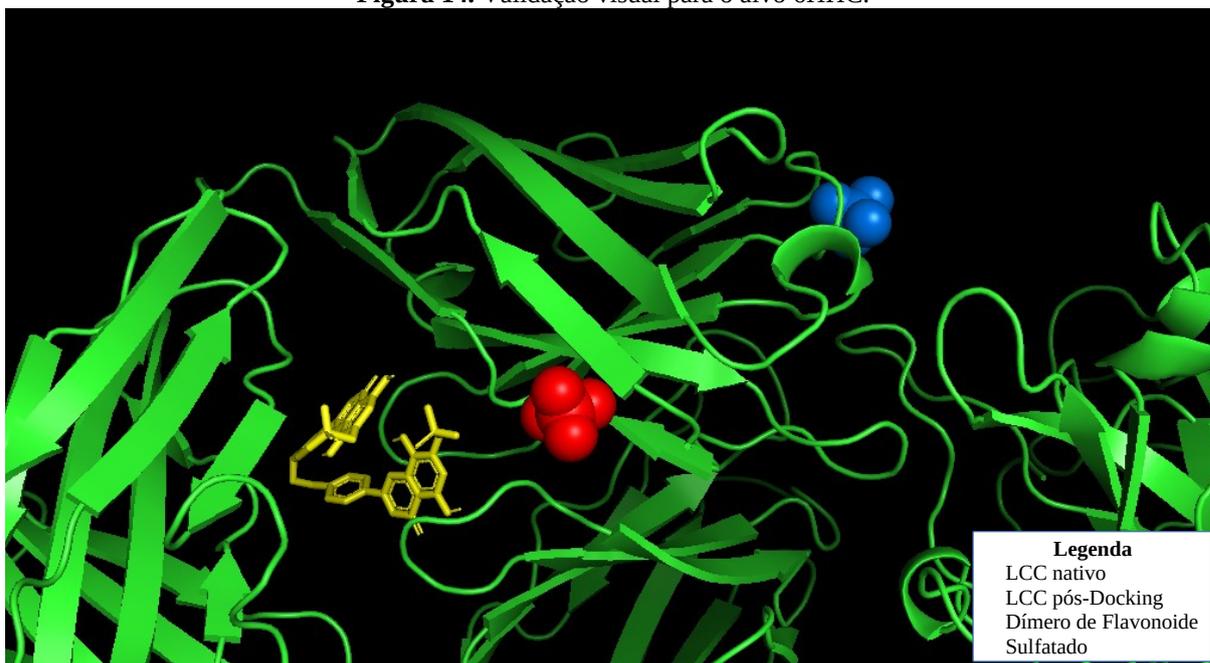
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 13. Validação visual para o alvo 5QOD.



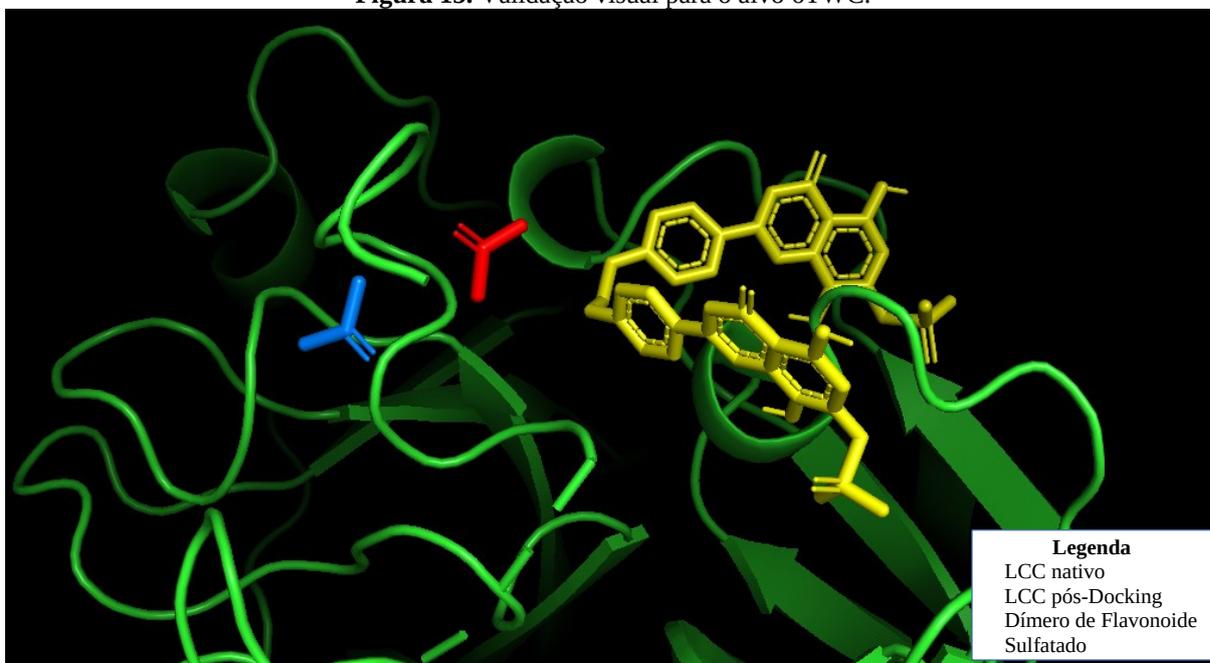
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 14. Validação visual para o alvo 6HHC.



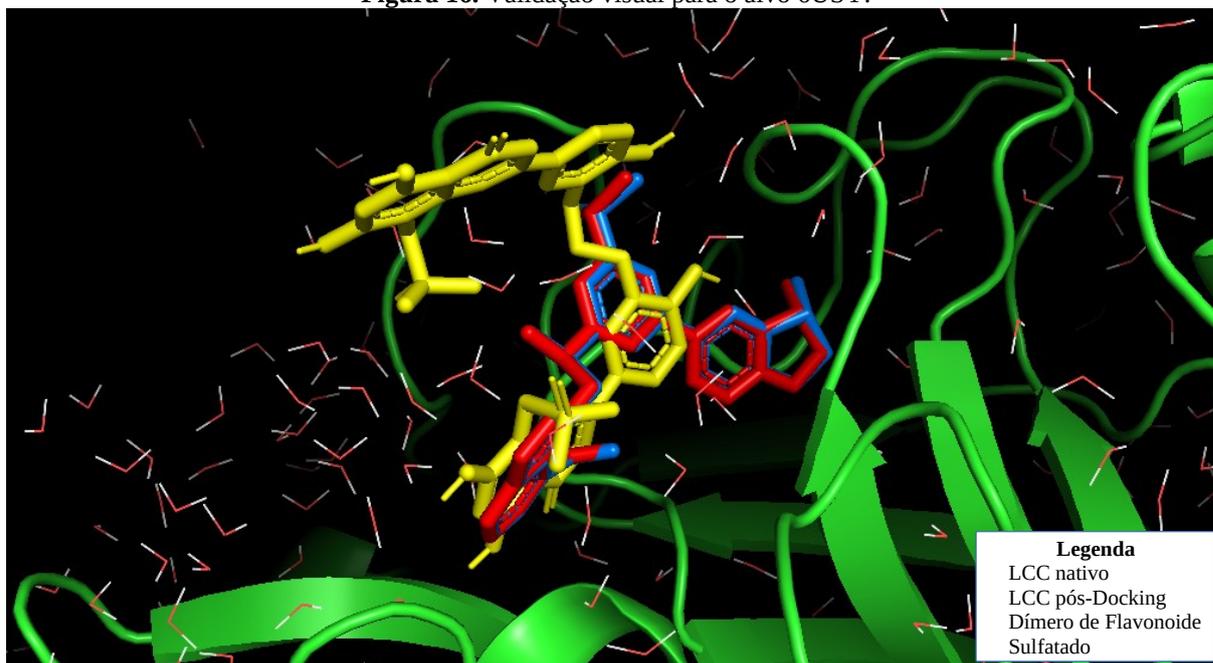
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 15. Validação visual para o alvo 6TWC.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 16. Validação visual para o alvo 6USY.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17. Validação visual para o alvo 6W50.

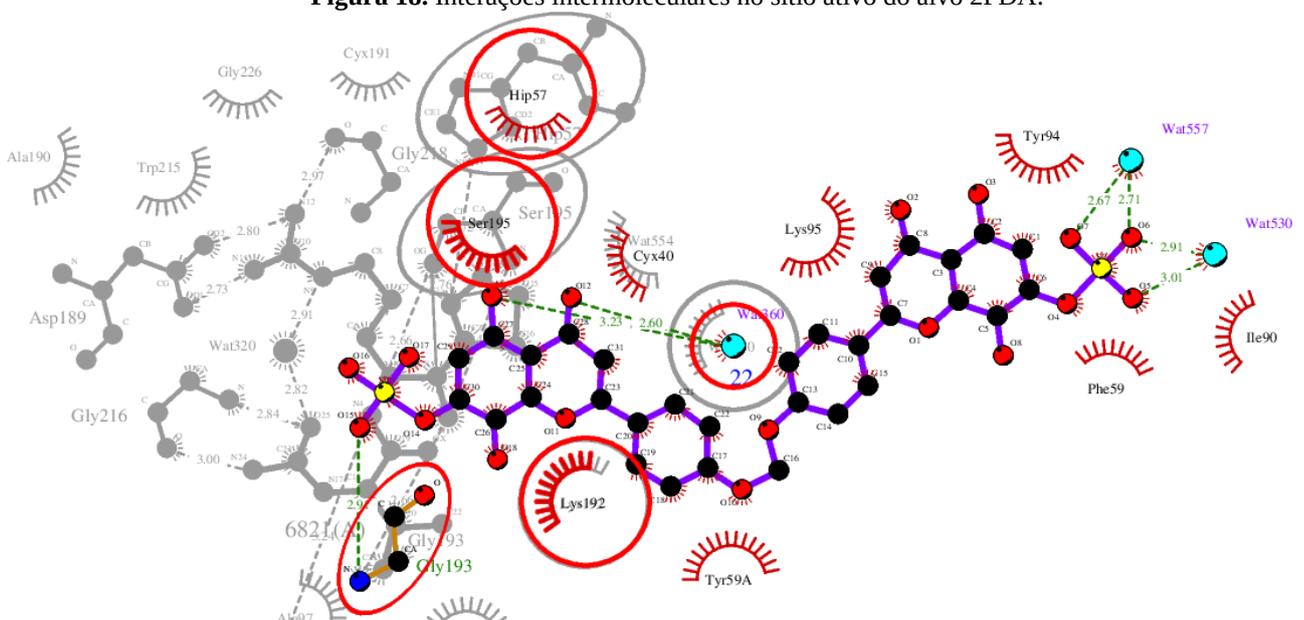


Fonte: Elaborado pelo autor

Observa-se nas Figuras 3-11 o resultado da validação visual do método. A partir destas, percebe-se que o método se mostrou satisfatório, uma vez que para mais da metade dos alvos, a simulação de *docking* levou as moléculas em estudo a ancorarem no sítio ativo das proteínas indicados no *gridbox*. Melhorias podem ser implementadas com o fim de aprimorar a acurácia do método, contudo, estes resultados reforçam a confiabilidade do método empregado.

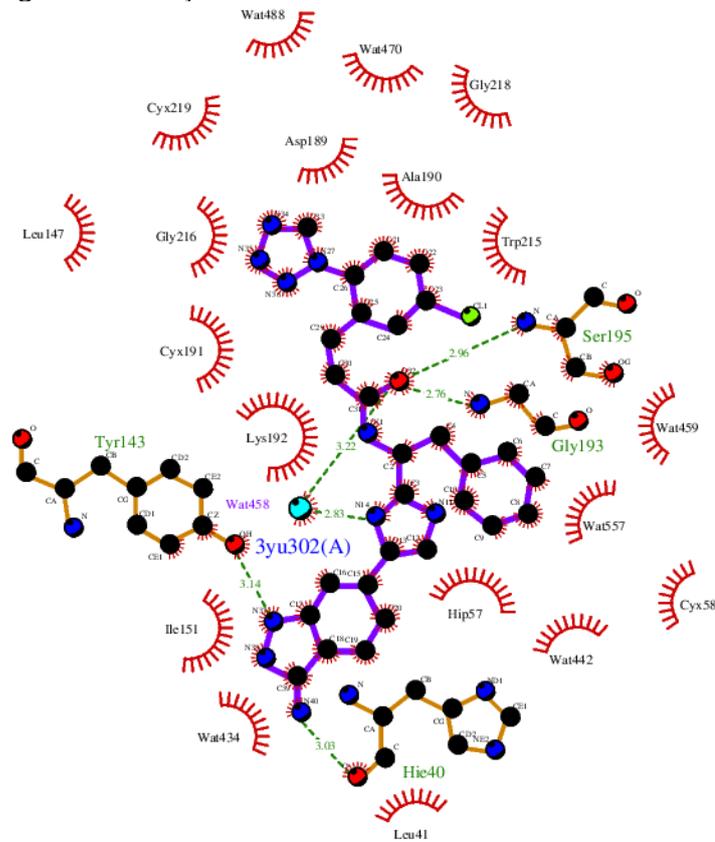
Em seguida, fez-se uso também do software LigPlot⁺, a partir do qual é gerado um mapa bidimensional que permite identificar as interações intermoleculares entre o ligante e os resíduos da proteína, diferenciando entre interações hidrofílicas e hidrofóbicas.

Figura 18. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 2FDA.



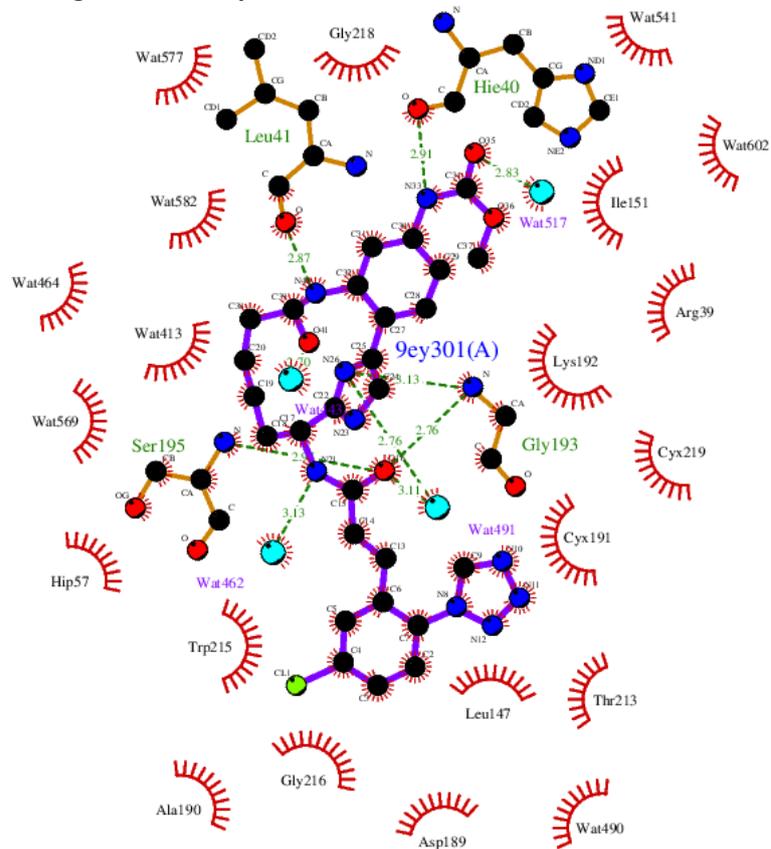
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 21. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 4X6P.



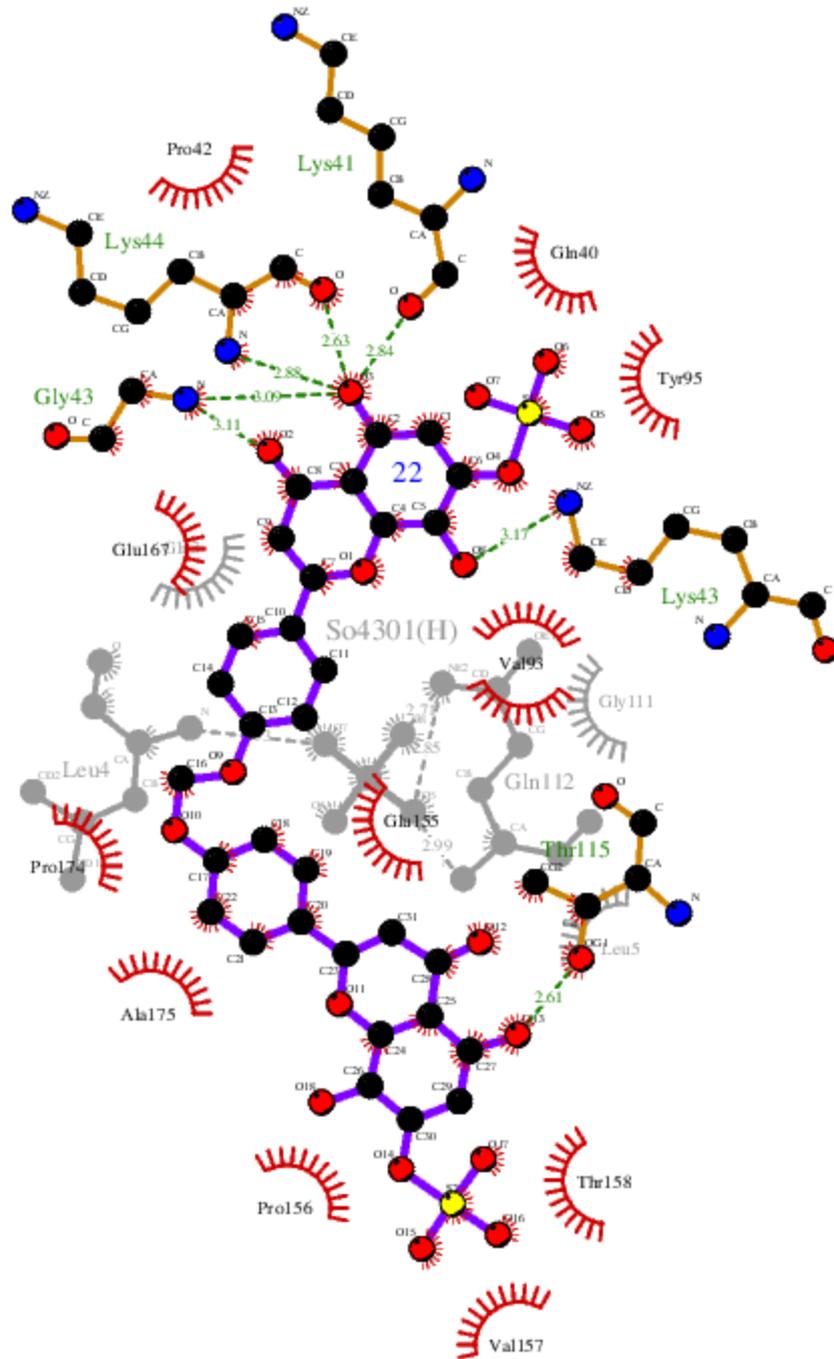
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 22. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 5Q0D.



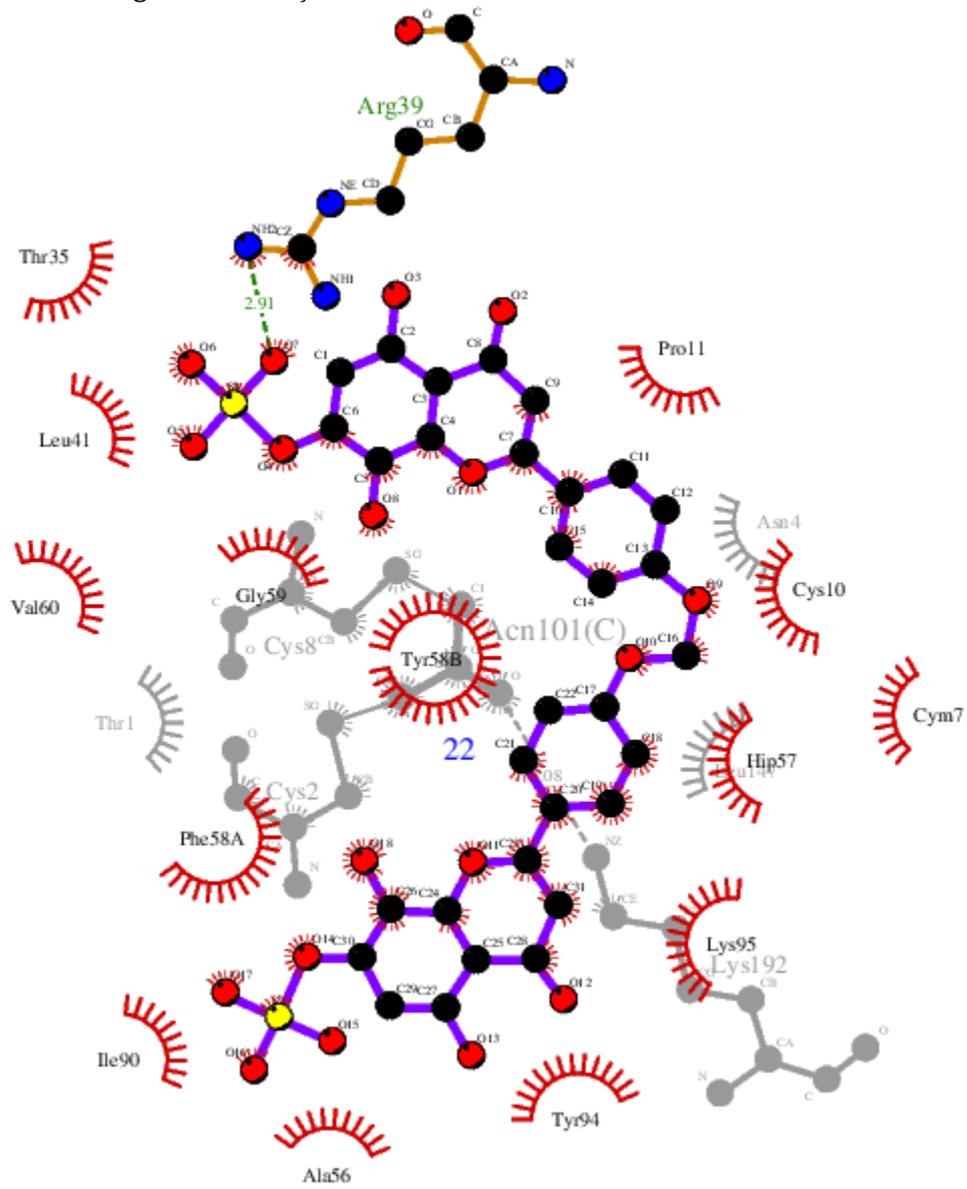
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 24. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6HHC.



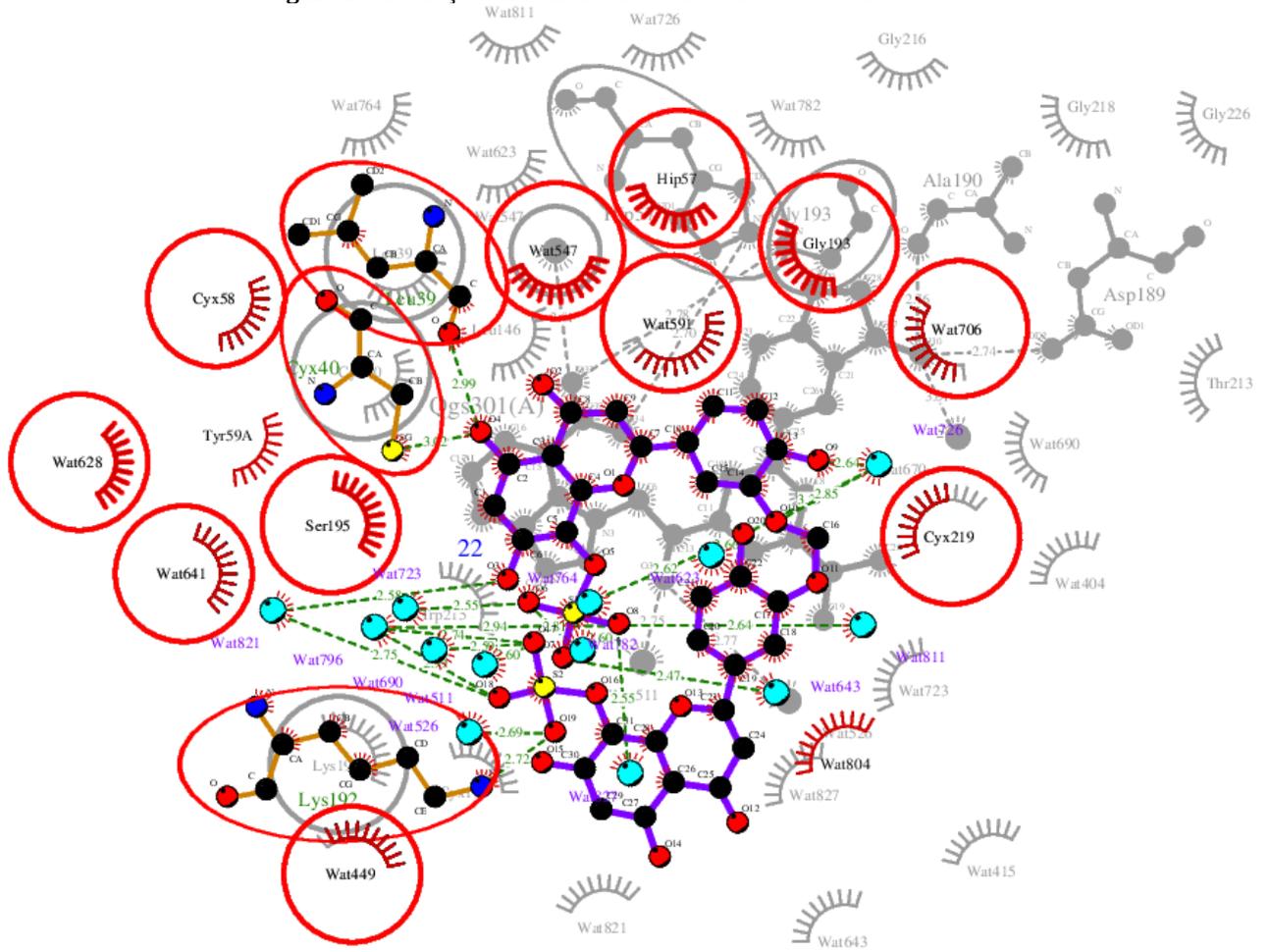
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 25. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6TWC.



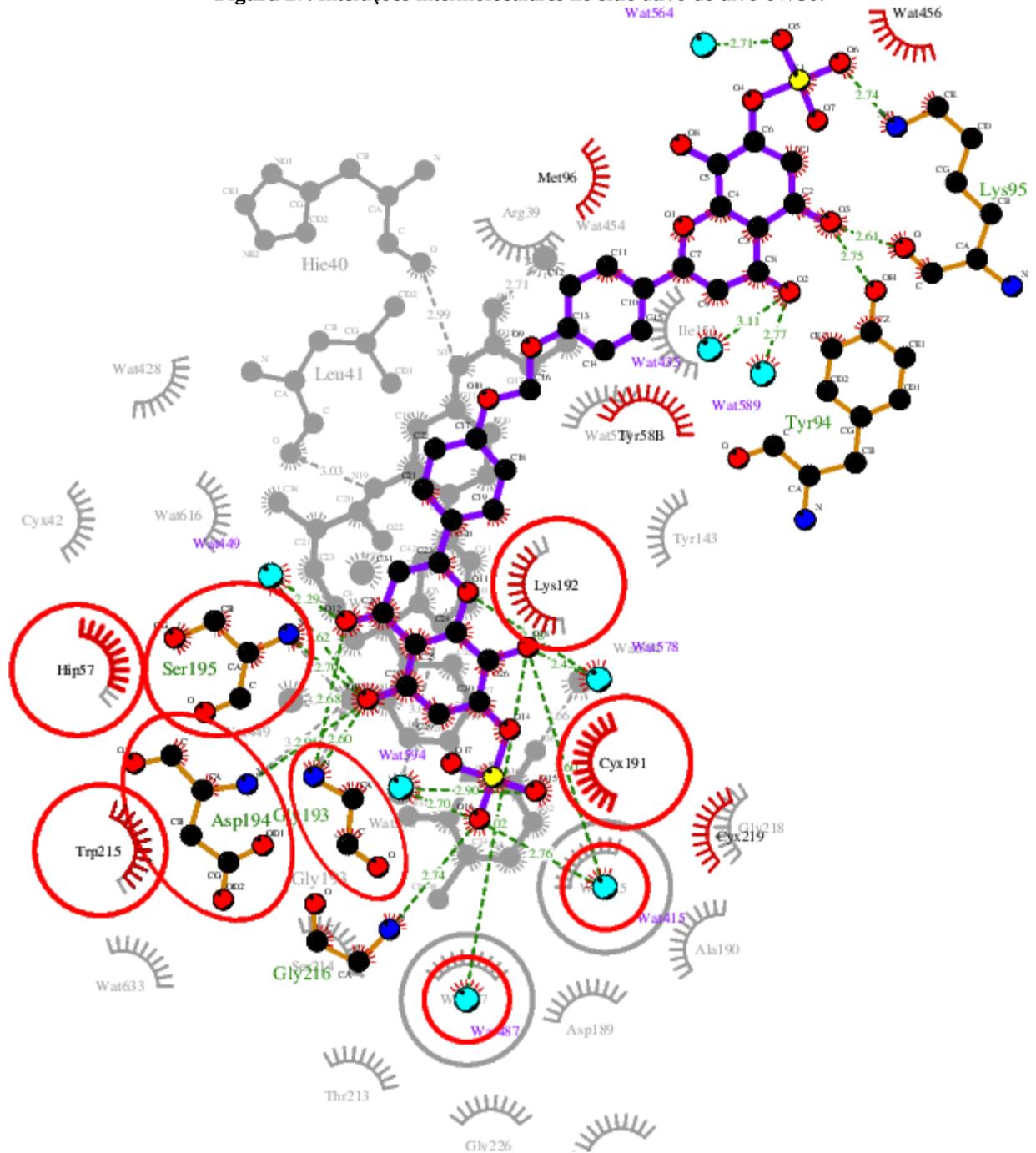
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 26. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6USY.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 27. Interações intermoleculares no sítio ativo do alvo 6W50.



Fonte: Elaborado pelo autor

5.5 Redocking

Afim de se certificar que os resultados não dependem do método para que se mostrem satisfatórios, foi realizado uma etapa de redocking. O redocking consiste em repetir os cálculos utilizando um algoritmo diferente. Para o cumprimento desta etapa, foi empregado o SwissDock, ferramenta online baseada no programa EADock DSS, e emprega uma função de scoring cujos parâmetros são gerados empregando-se o campo de força CHARMM.

Como critério para a realização do redocking, foram selecionados apenas os complexos com menor valor de energia de ligação entre os ligantes propostos, e entre os ligantes de referência. Os valores obtidos encontram-se na tabela 9.

Tabela 9. Valores de energia livre de ligação removendo-se as águas de cristalização

Alvo	Energia Ligante Referência (kcal)	Ligantes de Referência	Energia Ligante Proposto (kcal)	Ligantes Propostos
2fda	-10.98	BDBM289853	-11.53	Dibeltraonina
3sor	-10.27	BDBM289853	-12.46	Dicaicoina
4cr9	-10.91	BDBM289853	-11.91	Diyannina
4x6p	-08.46	BDBM289803	-10.56	Dicaicoina
5q0d	-08.40	BDBM289849	-12.23	Dibeltraonina
6hhc	-11.16	BDBM289853	-12.21	Dibeltraonina
6twc	-10.78	BDBM289853	-11.52	Dibeltraonina
6usy	-11.10	BDBM289853	-12.14	Dipedroina
6w50	-08.23	BDBM289844	-10.69	Dibeltraonina

Fonte: Elaborado pelo autor

Os valores obtidos na etapa do redocking diferem dos valores observados para a etapa do docking, contudo, a margem de diferença é relativamente pequena. Além disso, mesmo com a margem de erro, observa-se que o padrão se manteve, isto é, para todos os alvos, o ligante proposto apresentou um valor de afinidade superior ao ligante de referência.

Estes dados corroboram para uma boa avaliação do método empregado, uma vez que os valores não divergiram de forma tão expressiva. Além disso, uma vez que o padrão manteve-se, é válido afirmar que os resultados obtidos independem do algoritmo aplicado, visto que os algoritmos aqui aplicados se baseiam em um conjunto diferente de equações e parâmetros para descrever os sistemas em estudo.

6 CONCLUSÕES

Os docking molecular é um método confiável, de fácil manuseio e de acesso irrestrito. O seu uso se faz eficiente para avaliação de pequenos ligantes orgânicos para inibição enzimática, contribuindo satisfatoriamente para o processo de descobrimento de novos fármacos.

Neste trabalho, foram avaliadas duas diferentes funções de *scoring*, Dkoes e Vinardo, apresentando esta última um resultado mais satisfatório, o que indica que esta possui um conjunto de parâmetros que descreve de forma mais eficaz o sistema em estudo. Foram testados diferentes tamanhos para o *gridbox*, sendo os melhores resultados obtido configurando-o em 30 Å³.

Avaliou-se também a influência da presença de águas de cristalização nas proteínas, comprovando-se que a inclusão destas desenvolve um papel importante, influenciando consideravelmente nas interações entre a proteína e o ligante, e conseqüentemente, nas propriedades termodinâmicas do complexo, inclusive a energia livre de ligação.

O conjunto de dímeros baseado em éteres de flavonoides sulfatos, apresentou uma menor energia de ligação comparado às moléculas originais, a partir das quais os dímeros foram baseados, indicando um maior desempenho.

Por fim, conclui-se que os dímeros baseado em éteres de flavonoides sulfatos, aqui denominados de Dibeltroanina, Dicaicoina, Dipedroina, Diwissadulina e Diyannina, mostraram-se eficientes na inibição enzimática do Fator de Coagulação IX, que está ligado à ocorrência da trombose.

O conjunto de dímeros são promissores candidatos a fármacos, e em razão disso, estão sendo desenvolvidos estudos de dinâmica molecular e cálculo da energia livre, afim de investigar mais profundamente o potencial dessas moléculas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBER. **The Amber Home Page**: Tools for Molecular Simulations, 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://ambermd.org/>>. Acesso em: 26 de abr. de 2020.
- AUTODOCK TOOLS. **Autodock**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/>>. Acesso em: 26 de abr. de 2020.
- AZEVEDO JR, W. F. *Docking Screens for Drug Discovery*. 1. ed. New York: Humana, 2019.
- BINDINGDB. **BindingDB**: The Binding Database, 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>>. Acesso em: 26 de abr. de 2020.
- BERG, J. M. *Bioquímica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- BJERRUM, E. J. Development of a machine-learning model to predict Gibbs free energy of binding for protein-ligand complexes. *Biophysical Chemistry*, v. 62, p. 133–144, 2016.
- BROWN, T. A. *Bioquímica*. 1. ed. Rio de Janeiro: Pearson, 2008.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. *Bioquímica*. 2 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. Estudo da Cascata de Coagulação Sanguínea e seus Valores de Referência. *Acta Veterinaria Brasileira*, v.1, n.2, p.49-55, 2007.
- CORREIA-DA-SILVA, M.; SOUSA, E.; MADALENA, M. M. P. Development of a machine-learning model to predict Gibbs free energy of binding for protein-ligand complexes. *Medicinal Research Reviews*, v. 0, p. 1–57, 2013.
- DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*, v. 32, 665-667, 2004.
- FERRIER, DENISE R. et al. *Bioquímica Ilustrada*. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.
- FRANCO, R. F. Fisiologia Da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise. *Acta Veterinaria Brasileira*, v.34, p. 229-237, 2001.
- FREY, M. Water Structure Associated with Proteins and its Role in Crystallization. *Acta Crystallographica*, v. 50, p. 663-666, 1994.
- GAUSSVIEW **Gaussian**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<http://gaussian.com/>>. Acesso em: Acesso em: 26 de abr. de 2020.
- GIMENO, A. et al. The Light and Dark Sides of Virtual Screening: What Is There to Know? *Internacional Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 1375, 2019.
- GOVINDARAJ, R. G.; BRYLINSKI, M. Comparative Assessment Of Strategies To Identify Similar Ligand-Binding Pockets In Proteins. *BMC Bioinformatics*, v. 19, n. 91, 2018.

JAGHOORI, M.M. et al. Vinardo: 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *Journal Computed-Aided Molecular Design*, v. 30, p. 237-249, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Bioquímica Ilustrada*. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

LIGPLOT. **EMBL-EBI**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>>. Acesso em: 26 de abr. de 2020.

KADUKOVA, M., GRUDININ, S. Convex-PL: A Novel Knowledge-Based Potential For Protein-Ligand Interactions Deduced From Structural Databases Using Convex Optimization. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v.31, p. 943–958, 2017.

KOES, D. R.; BAUMGARTNER, M. P.; CAMACHO; C. J. Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, p. 1893–1904, 2013.

KOES, D. R. **SMINA**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<http://smina.sf.net> >. Acesso em: 26 de abr. de 2020.

LAPE, M. et al. Comparison of current docking tools for the simulation of inhibitor binding by the transmembrane domain of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Biophysical Chemistry*, v. 150, p. 88–97, 2010.

LE GLILLOUX, V. et al. Pocket: An Open Source Platform For Ligand Pocket Detection. *BMC Bioinformatics*, v. 10, n. 168, 2009.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MOSIER, P. D. et al. On the Specificity of Heparin/Heparan Sulfate Binding to Proteins. Anion-Binding Sites on Antithrombin and Thrombin Are Fundamentally Different. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEUDERT, G.; KLEBE, G. fconv: Format conversion, manipulation and feature computation of molecular data. *Bioinformatics*, v. 27, n. 7, p. 1021-1022, 2011.

PAGADALA, N. S. et al. Software for molecular docking: a review. *Biophysical Review*, v. 9, p. 91–102, 2017.

PALTA, S.; RICHA SAROA, A.; PALTA, A. Overview of the Coagulation System. *Indian Journal of Anaesthesia*, v. 58, p. 515–523, 2014.

PDB2PQR. **Poisson Boltzmann**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr> >. Acesso em: 21 de ago. de 2021.

PYMOL. **PyMOL by Schrödinger**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://pymol.org/2/>>. Acesso em: Acesso em: 26 de abr. de 2020.

QUIROGA, R.; VILLARREAL, M.A. Vinardo: A Scoring Function Based on Autodock Vina Improves Scoring, Docking, and Virtual Screening. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5, 2016.

RCSB. **RCSB Protein Data Bank**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acesso em: Acesso em: 26 de abr. de 2020.

SARGSYAN, K.; GRAUFELL, C.; LIM, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, v. 13, p. 1518–1524, 2017.

SMINA. **Source Forge**, 2020. Página inicial. Disponível em: <<http://smina.sf.net>>. Acesso em: Acesso em: 26 de abr. de 2020.

STRYER, L. et al. *Bioquímica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SWISSDOCK. **Swiss Institute of Bioinformatics**, 2021. Página inicial. Disponível em: <<http://www.swissdock.ch/docking>>. Acesso em: 27 de nov. de 2021.

TELES, Y. C. F.; SOUZA, M. S. R.; SOUZA, M. F. V. Sulphated Flavonoids: Biosynthesis, Structures, and Biological Activities. *Molecules*, v. 23, n. 480, 2018.

TELES, Y. C. F. et al. New Sulphated Flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). *Molecules*, v. 20, p. 20161–20172, 2015.

TANCHUK, V.Y. et al. A New, Improved Hybrid Scoring Function for Molecular Docking and Scoring Based on AutoDock and AutoDock Vina. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 87, p. 618–625, 2015.

UCSF CHIMERA. **RBVI**. : tecnologia que interessa, 2020. Página inicial. Disponível em: <<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>>. Acesso em: Acesso em: 26 de abr. de 2020.

VERLI, H. *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular*. 1. ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

XTB. **XTB Doc**, 2021. Página inicial. Disponível em: <<https://xtb-docs.readthedocs.io/>>. Acesso em: Acesso em: 17 de mai. de 2021.