



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCA JESSICA PENHA RIBEIRO

**PROSPECÇÃO *IN SÍLICO* DE BILOBALÍDEOS, GINKGOLÍDEOS E SEUS
DERIVADOS COM POTENCIAL INIBITÓRIO SOBRE A PROTEASE DO SARS-
COV-2: 3CLPRO (*MAIN PROTEIN*)**

FORTALEZA

2023

FRANCISCA JESSICA PENHA RIBEIRO

PROSPECÇÃO *IN SÍLICO* DE BILOBALÍDEOS, GINKGOLÍDEOS E SEUS
DERIVADOS COM POTENCIAL INIBITÓRIO SOBRE A PROTEASE DO SARS-
COV-2: 3CLPRO (*MAIN PROTEIN*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Dr. Geancalo Zanatta.

Coorientadora: Dra. Maria da Conceição Ferreira Oliveira.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R380p Ribeiro, Francisca Jessica Penha.

Prospecção in silico de bilobalídeos, ginkgolídeos e seus derivados com potencial inibitório sobre a protease do SARS-COV-2: 3CLPro (Main Protein) / Francisca Jessica Penha Ribeiro. – 2023.

83 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Geancalo Zanatta.

Coorientação: Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira Oliveira.

1. Nutracêuticos. 2. Ginkgo biloba. 3. SARS-CoV-2. 4. Mpro. 5. Ancoramento molecular. I. Título.

CDD 572

FRANCISCA JESSICA PENHA RIBEIRO

PROSPECÇÃO *IN SÍLICO* DE BILOBALÍDEOS, GINKGOLÍDEOS E SEUS
DERIVADOS COM POTENCIAL INIBITÓRIO SOBRE A PROTEASE DO SARS-
COV-2: 3CLPRO (*MAIN PROTEIN*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 29/03/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Geancarlo Zanatta (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Homero Dewes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

A Deus.

Aos meus pais, Manoel e Eriza.

Minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A Deus, que me deu uma nova chance de fazer a diferença.

A Capes que proveu fomento para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia molecular e bioquímica que me capacitou e auxiliou no aprimoramento das minhas habilidades acadêmicas.

Ao meu orientador Dr. Geancarlo Zanatta que, em meio a uma pandemia, aceitou me orientar com excelência, paciência, maestria e com total didática de forma totalmente remota e enfrentando muitos desafios e dificuldades.

A minha coorientadora Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira que, com sua vasta experiência e apoio, enriqueceu meu trabalho.

Aos meus pais Eriza e Manoel que me deram total apoio.

Ao meu grupo de pesquisa formado por: Ma. Fernanda, Ma. Joseli, Lucas e Ubirajara.

Aos colegas Ms. Jonatas e Wescley que me auxiliaram compartilhando seus conhecimentos técnicos e aplicações de bioinformática.

Aos meus colegas de turma da Pós-graduação Francisco, Natália e Talita, que dividimos angústias, conhecimentos e as glórias de vencer cada etapa de realizar um curso em meio a uma pandemia.

RESUMO

Em 2019, na cidade de Wuhan, na China, foi identificada uma nova patologia causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2. Essa patologia ficou conhecida como COVID-19 e apresenta sintomas iniciais variados comumente relacionados à pneumonia e com quadro de rápida evolução e óbito. Até o presente momento, mais de 776 milhões de pessoas foram infectadas no mundo e 7,06 milhões perderam a vida. Como resposta a essa ameaça, esforços globais foram coordenados para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos efetivos. Nesse contexto, a protease principal (3CLpro ou Mpro) está entre o principal alvo terapêutico do SARS-Cov-2, que é responsável pela clivagem e ativação das proteínas necessárias durante a replicação viral. Apesar dos esforços, a inibição farmacológica dessas enzimas tem se mostrado desafiadora. Neste trabalho, utilizamos ferramentas de desenvolvimento de fármacos baseados em computação para identificar novos compostos com potencial atividade inibitória da Mpro, através do estudo de metabólitos 2° do *Ginkgo biloba* (ginkgolídeos e bilobalídeos) e seus derivados. Para melhor avaliar o espaço químico acessível nesse alvo terapêutico, a flexibilidade inerente dessa enzima foi explorada através do uso da estratégia de *ensemble docking*, na qual um conjunto conformacional dessa proteína foi utilizado para caracterizar a interação com os compostos propostos. Estratégias de ampliação de espaço químico, análise de propriedades farmacocinéticas, facilidade de síntese, bem como perfil de interação com resíduos do sítio catalítico serão amplamente empregadas para gerar uma biblioteca de compostos derivados testados. Técnicas de dinâmica molecular estendida serão utilizadas para caracterizar o seu perfil de inibição. Com resultados de *docking*, foi observado que os ligantes se apresentavam pequenos para o sítio, portanto, as melhores energias de interação dos bilobalídeos foram BLBLD D1(-7,88), BLBLD D2 (-8,17), BLBLD D3 (-7,81), BLBLD D4 (-7,87), BLBLD D5 (-7,55), BLBLD D6 (-7,59), BLBLD SKL (-7,51) e BLBLD PNI (-7,83). Já para os ginkgolídeos, as melhores energias foram GINKGD1(-8,57), GINKGD 2 (-9,61), GINKGD 3(-9,29), GINKGD 4 (-8,56), GINKGD 5 (-9,29), GINKGD 6 (-9,01), GINKGD 7 (-8,55), GINKGD 8 (-8,54), GINKGD 9 (-8,36), GINKGD 10 (-8,56), GINKGD 11 (-8,82), GINKGD 12 (-8,83), GINKGD 13 (-9,43) e GINKGD 14 (-8,52). Seguindo para a etapa de derivação através do LigBuilder todos os ligantes foram submetidos, porém, por seletividade do software, os que produziram derivados viáveis foram do BLBLD D1 e BLBLD D2, gerando 2003 moléculas ao total. Essas

moléculas foram submetidas ao re-scoring com Vina e, posteriormente, ao ADME para aferição das propriedades farmacocinéticas tendo apenas o candidato derivado do BLBLD D1 do cluster 1 ligante que apresentou duas violações das regras de Lipinski, logo após, os melhores candidatos (C7L1, C62L2 e C72L4) foram submetidos a dinâmica molecular de 300ns. Assim sendo, o C7L1 apresentou características promissoras para inibir a Mpro com interações com o sítio catalítico e estabilidade de ligação do complexo proteína ligante. Os resultados obtidos guiarão o desenho racional de novos agentes terapêuticos inspirados em nutracêuticos (produtos naturais) e motivarão a síntese dos compostos promissores para testes *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: nutracêuticos; *Ginkgo biloba*; SARS-CoV-2; Mpro; ancoramento molecular.

ABSTRACT

In 2019, a new pathology caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2 was identified in the city of Wuhan in China. This pathology became known as COVID-19 and presents varied initial symptoms, commonly related to pneumonia and with a rapidly evolving picture and death. To date, more than 776 million people have been infected worldwide, and 6.87 million have lost their lives. In response to this threat, global efforts have been coordinated to develop effective vaccines and drugs. In this context, among the main therapeutic targets of SARS-Cov-2 is the major protease (3CL_{pro} or M_{pro}), which is responsible for cleavage and activation of proteins required during viral replication. Despite efforts, pharmacological inhibition of these enzymes has proven challenging. In this work, we used computational-based drug development tools to identify new compounds with potential M_{pro} inhibitory activity by studying 2nd metabolites from Ginkgo biloba (ginkgolides and bilobalides) and their derivatives. To better assess the accessible chemical space in this therapeutic target, the inherent flexibility of this enzyme was explored using ensemble docking strategy, where a conformational assembly of this protein was used to characterize the interaction with the proposed compounds. Strategies of chemical space enlargement, analysis of pharmacokinetic properties, ease of synthesis, as well as interaction profiling with catalytic site residues will be extensively employed to generate a library of tested derivative compounds. Extended molecular dynamics techniques used to characterize their inhibition profile. With docking results, it was observed that the ligands were small to the site, so the best interaction energies of the bilobalides were BLBLD D1(-7.88), BLBLD D2 (-8.17), BLBLD D3 (-7.81), BLBLD D4 (-7.87), BLBLD D5 (-7.55), BLBLD D6 (-7.59), BLBLD SKL (-7.51) and BLBLD PNI (-7.83). For the ginkgolides the best energies were GINKGD1(-8.57), GINKGD 2 (-9.61), GINKGD 3(-9.29), GINKGD 4 (-8.56), GINKGD 5 (-9.29), GINKGD 6 (-9, 01), GINKGD 7 (-8.55), GINKGD 8 (-8.54), GINKGD 9 (-8.36), GINKGD 10 (-8.56), GINKGD 11 (-8.82), GINKGD 12 (-8.83), GINKGD 13 (-9.43) and GINKGD 14 (-8.52). Moving on to the derivation step using LigBuilder all ligands were submitted, but by selectivity of the software the ones that produced viable derivatives were from BLBLD D1 and BLBLD D2, generating 2003 molecules in total. These molecules were subjected to re-scoring with Vina and then to ADME to ascertain the pharmacokinetic properties with only the candidate derived from BLBLD D1 of cluster 1 ligand showing two violations of Lipinski rules, soon after

the best candidates (C7L1, C62L2 and C72L4) were subjected to 300ns molecular dynamics. Therefore, C7L1 showed promising features to inhibit Mpro with interactions with the catalytic site and binding stability of the protein-binding complex. The results found will guide the rational design of new therapeutic agents inspired by nutraceuticals (natural products) and motivate the synthesis of promising compounds for in vitro and in vivo testing.

Keywords: nutraceuticals; ginkgo biloba; SARS-CoV-2; Mpro; molecular docking.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Enzima conversora de angiotensina
CHARMM	Chemistry at Harvard Molecular Mechanics
Mpro	Main protein
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ORFs	Quadros de leituras abertas
PAF	Fator de ativação plaquetári
PME	Partícula mesh Ewald
RNA	Ácido ribonucléico
RMSD	Raiz quadrada do desvio quadrático médio
RpRd	RNA dependente de RNA polimerase
TMPRSS2	Protease transmembrana serina 2
FDA	Food Drug Administration

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	Pandemia de COVID-19	14
2.1.1	<i>Genômica viral do SARS-CoV-2</i>	14
2.1.2	<i>Medicamentos aprovados para o SARS-CoV-2</i>	15
2.1.3	<i>Vacinas de uso emergencial contra SARS-CoV-2</i>	16
2.1.4	<i>Bioquímica celular viral</i>	17
2.2	Protease tipo cisteína	18
2.2.1	<i>Protease principal (Mpro, do inglês, Main protease)</i>	18
2.3	Plantas e seus compostos químicos aplicados à saúde	19
2.3.1	<i>Nutracêuticos</i>	20
2.3.2	<i>Ginkgo biloba como fonte de nutracêuticos</i>	21
2.4	Bioinformática estrutural aplicada ao desenvolvimento de medicamentos	22
3	METODOLOGIA	24
3.1	Seleção de compostos e construção da biblioteca de derivados ...	24
3.2	Conjunto conformacional das proteínas alvo	25
3.3	Ancoramento molecular com múltiplas conformações proteicas ...	25
3.4	Desenho de derivados moleculares	26
3.5	Simulações de estabilidade do complexo proteína-inibidor	27
3.6	ADME	28
3.7	Visualização dos resultados e produção de imagens	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1	Interação entre BLBLD, GINKGD e Mpro	30
4.2	Derivados estruturais	54
4.3	Análise e classificação dos novos derivados estruturais	56
4.4	ADME	63
4.5	Dinâmica molecular (DM)	65
5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A - TABELA COM TODOS OS VALORES DE ENERGIA DE INTERAÇÃO DOS DERIVADOS DA MOLÉCULA BLBLD D1	78

**ANEXO B - TABELA COM TODOS OS VALORES DE ENERGIA DE
INTERAÇÃO DOS DERIVADOS DA MOLÉCULA BLBLD D2**

1 INTRODUÇÃO

O objetivo geral deste estudo é identificar as moléculas de Ginkgo biloba com potencial para inibição de proteína Mpro (Main protein) do SARS-CoV-2. Nossos objetivos específicos são: caracterizar o perfil de interação de bilobalídeos, ginkgolídeos e seus derivados no sítio catalítico da Mpro; gerar um conjunto de compostos derivados com base na estrutura do sítio catalítico da proteína alvo; e testar a estabilidade e o perfil de energia do complexo inibidor de proteína usando os compostos gerados na etapa anterior.

No final de 2019, surgiram muitos casos de uma doença respiratória que se assemelhava à pneumonia em uma pequena província na China. Enquanto o número de casos aumentava exponencialmente, estudos eram realizados e descobriram o causador ser um vírus ainda não identificado em humanos (Kim et al., 2020).

Pesquisadores identificaram sendo um tipo de coronavírus novo, causador da doença respiratória que rapidamente progredia para uma síndrome respiratória aguda grave (Dias et al., 2020; Wu et al., 2020; Xiong et al., 2021). Devido suas características em comum com a família de vírus SARS-CoV, foi nomeado de SARS-CoV-2. A situação epidemiológica passou de uma epidemia para uma pandemia, pois já havia alcançado os cinco continentes do planeta rapidamente (Bhardwaj e Purohit, 2021; Gross et al., 2020; Klemm et al., 2020).

Diante da ascensão da patologia e sua progressiva letalidade, bem como o espectro de mutações que surgem a todo momento, foram necessários tratamentos com fármacos, vacinas e alternativas e iniciou-se uma busca por uma forma de combatê-la. Portanto, é necessário ter ciência do sequenciamento genético, do metabolismo celular e os mecanismos que incidem em todo maquinário biológico do vírus em estudo.

À medida que os estudos decifraram correlações importantes do ciclo viral em humanos, suas etapas foram sendo base de estudo para uma provável via de intervenção, assim chamando atenção às proteínas celulares que são responsáveis por processos como replicação viral, entre outros (Main et al., 2022). A protease principal (3-chymotrypsin like protein) 3CLpro do SARS-CoV-2 tornou-se alvo para estudos. Dentre as metodologias científicas empregadas no combate da pandemia

está a bioinformática estrutural, que dispõe de ferramentas que permitem a simulação de sistemas biológicos.

Essas ferramentas computacionais são estratégicas por possibilitar a modelagem de complexos formados pela proteína viral e um possível inibidor. Toda essa dinâmica é baseada em cálculos matemáticos e físicos avançados (Marinou et al., 2018).

Investigamos baseados em estudos indicativos de moléculas de origem vegetal com potencial ação inibitória dessa protease. Os benefícios de fitofármacos na saúde humana são descritos na literatura como promissores em patologias como: câncer, Alzheimer, HIV, entre outras. Nessa busca, um grupo vegetal chamou atenção: o *Ginkgo Biloba* com diversas aplicações medicinais (Ibrahim, Ramadan e Mohammed, 2021).

As moléculas selecionadas através de estudos de suas propriedades químicas sinalizaram para grupos de moléculas, tais como os ginkgolídeos e bilobalídeos, e derivados. Esses, por sua vez, foram objeto de ensaios em testes computacionais, aplicando a estratégia de (*ensemble docking*), nas quais as proteínas-alvo foram utilizadas em conjunto conformacional a fim de caracterizar a interação dos compostos em estudo. Assim, foram empregadas técnicas de dinâmica molecular e cálculo de energia livre de vinculação para apontar a estabilidade dos compostos testados e detalhar seu perfil de inibição (Rouchka, Chariker e Chung, 2020; Stein et al., 2021; Xiao et al, 2019).

Os resultados obtidos possuem o potencial de guiar estudos futuros relacionados à síntese e testes in vitro e in vivo de novos agentes terapêuticos, inspirados em nutracêuticos (produtos naturais), para o combate do SARS-CoV-2.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Pandemia de COVID-19

No mês de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, foi identificado um novo coronavírus em que os pacientes infectados apresentavam sintomas que eram relacionados à pneumonia como: febre, tosse seca e falta de ar progressiva (Bhowmick et al., 2020). A transmissão da doença se tornou global em um curto período, além disso, a infecção leva a quadros severos de inflamação pulmonar grave, síndrome que apresentava sintomas como desconforto respiratório agudo, lesão cardíaca e renal, especialmente em pacientes com idade avançada e com comorbidades como: diabetes *mellitus*, hipertensão e insuficiência cardíaca (Dias et al., 2020; Wang et al., 2020; Yang et al., 2020).

Esse vírus pertence à ordem *Nirdovirales*, da família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae*. É um vírus que possui envoltório de um genoma de RNA de fita única e pertence ao gênero betacoronavírus. Era comumente causador de infecções enzoóticas em aves e mamíferos, no entanto, passou a ocorrer transmissão entre espécies diferentes chegando até aos humanos (Dias et al., 2020; Menachery, Graham e Baric, 2017). Logo, para entendermos todo maquinário viral é importante conhecer seus aspectos genéticos já descritos.

2.1.1 Genômica viral do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 possui genoma de RNA de fita simples RNA de fita simples (+ssRNA), polaridade positiva (3-5) e não segmentada, de aproximadamente 30 kb, e é genomicamente maior quando comparado aos outros vírus da mesma família (Lima, Souza e Lima, 2020). Em comparação a esse dado da genômica do SARS-CoV-2 e o SARS-CoV, possui diferenças nos genes *Spike*, *orf3a* e *orf8 ORF* - (quadros de leituras abertas) que são responsáveis pela ativação da resposta imunitária que desencadeia a ativação do inflamossoma, que é um complexo multiprotéico que atua diretamente na atuação de enzimas do tipo cisteína-aspartato (Lima, Souza e Lima, 2020; Paiva-Oliveira et al., 2012; Park et al., 2020).

Assim, no momento em que o vírus entra na célula do hospedeiro, inicia-se a tradução a fim de produzir proteínas não estruturais denominadas quadros de leitura

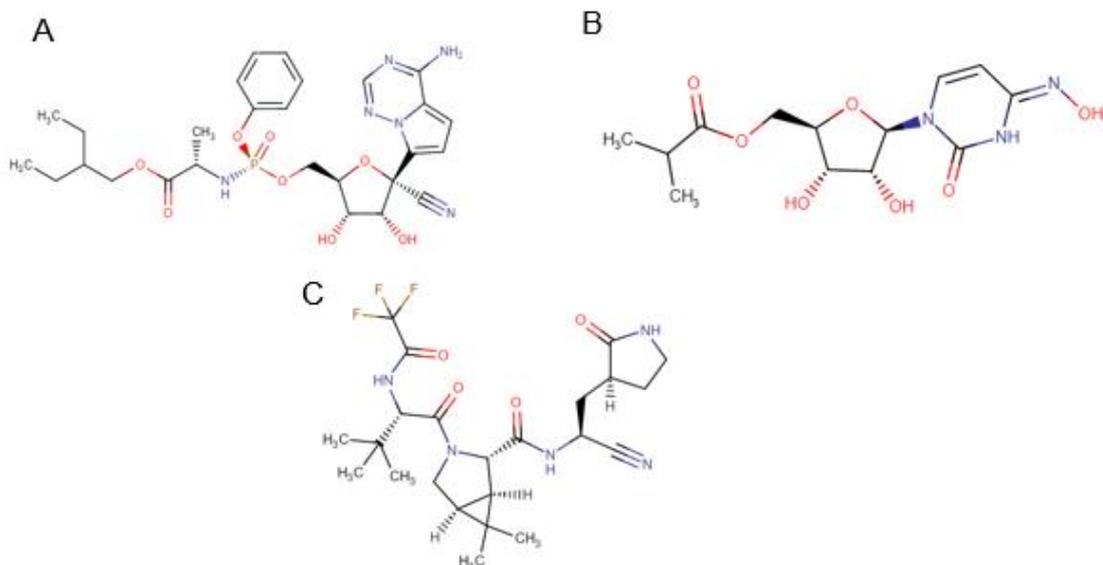
abertas (Orfs, do inglês, Open read frames), que são classificadas como Orf 1a e Orf 1b. A Orf1a é responsável pela produção do polipetídeo 1a que é segmentado em 11 proteínas não estruturais, tais como a proteína 9, proteína 15, e a Mpro. Por outro lado, a Orf1b dá origem a um enorme polipetídeo que é dividido em 15 proteínas não estruturais, produzidas através da clivagem seletiva realizada por proteases virais. O RNA genômico é envolvido pelas proteínas estruturais tais como as proteínas spike (S), proteína do envelope, de membrana (M), de nucleocapsídeo (N) e outras proteínas acessórias (Bhowmick et al., 2020; Kaushik et al., 2020; Ko et al., 2021). Essas proteínas são responsáveis pelo ancoramento viral com a célula do hospedeiro.

A partir da conhecida trilha dos mecanismos virais precedida por seu genoma e suas proteínas funcionais pode-se inferir um alvo molecular para uma investigação de uma possível inibição de seu ciclo de vida viral (Ahsan et al., 2021).

2.1.2 Medicamentos aprovados para o SARS-CoV-2

O maquinário do vírus requer uma célula hospedeira para que ele possa se replicar: o SARS-Cov-2 que apresenta habilidade a fim de reprogramar seu metabolismo de forma a favorecer e/ou acelerar a sua replicação e transmissão (Chazal e Gerlier, 2003; Novoa et al., 2005; Ou et al., 2020).

Figura 1 - Na figura 1A temos o remdeseivir, na 1B o molnupiravir e 1C o paxlovid.



Dentre os fármacos testados, temos o remdeseivir, como observado na figura 1A, produzido pela farmacêutica Gilead, um antiviral desenvolvido para tratamento do ebola e do vírus de Marburg (Dittmar et al., 2021). O que foi observado é a diminuição da necessidade de ventilação mecânica invasiva. O antiviral remdeseivir, desde 2020, recebeu aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) somente para uso emergencial para pacientes em estado grave (Beigel et al., 2020; Gordon et al., 2020).

O molnupiravir (figura 1B), fármaco da farmacêutica Merk, atua inserindo erros no código genético do vírus do SARS-CoV-2, assim, impedindo sua replicação. Foi recomendado seu uso emergencial apenas para maiores de 18 anos, porque sua ação interfere no crescimento dos ossos e cartilagens; e em estágio crítico, em que apresentou redução de hospitalizações e óbitos em cerca de 30% (Miran et al. 2021; Mourão et al., 2021; Syed, 2022).

O Paxlovid (figura 1C) é comercializado pela farmacêutica Pfizer e consiste em uma composição antiviral contendo nirmatelvir e ritonavirda, atuando diretamente sobre a atividade da protease principal Mpro (*Main Protein*) do SARS-CoV-2. Age como um inibidor covalente que se liga diretamente a um resíduo do aminoácido, a cisteína da enzima alvo. Foi aprovado para uso emergencial de uso oral, indicado para faixa etária de adultos e sob restrição prescrição médica aos que não precisaram de oxigênio suplementar e que apresentavam risco de agravamento da doença (Dias et al., 2020). Mostra eficácia contra as variantes de interesse (VOI's) e contra as variantes de preocupação (VOC's) (Greasley et al., 2022).

Dentre as recomendações de uso, estão: (i) não ser utilizado como profilaxia, (ii) ser utilizado no princípio da doença, (iii) não ser utilizado por mais de 5 dias, (iv) não utilizar durante a gravidez ou por acometidos de insuficiência renal grave ou falha renal (Marzi et al., 2022).

2.1.3 Vacinas de uso emergencial contra SARS-CoV-2

As vacinas já aprovadas possuem tipos de mecanismos de ação diferentes, que já estão em uso emergencial na população mundial:

Tabela 1 - Tabela com as principais vacinas aprovadas contra SARS-CoV-2.

Tipo de vacina	Vacina	Desenvolvida por:	Número de doses	Intervalo de tempo entre as doses
Vacina de vetores com deficiência de replicação	AstraZeneca	Oxford	2 + Reforço (Pfizer)	4 semanas
Vacina de vetores com deficiência de replicação	Jansen	Johnson & Johnson/ Janssen Pharma	1 + Reforço	Entre 12 semanas
Vacina de RNAm	Pfizer e BionTech	BioNTech, Fosun Pharma, Pfizer	2 + Reforço (Pfizer)	3 semanas
SARS-CoV-2 inativado	Coronavac	Sinovac	2+ Reforço	4 semanas
Vacina de vetores com deficiência de replicação	Sputnik V	Instituto de Pesquisa Gamaleya	Dose única	-
RNAm 1273	Moderna	Cambridge	2 Doses	4 semanas
SARS-CoV-2 inativado	Sinopharm	Blau Farmacêutica	2 Doses	3-4 semanas
SARS-CoV-2 inativado	Covaxin	Bharat BIOTECH	2 Doses	4 semanas
Ad5-nCoV-S recombinante	CanSino	Convidecia ®	Dose única	-
SARS-CoV-2 inativado com adjuvante	Valneva/VLA2001	Valneva SE	2 Doses	4 semanas
Partes do SARS-CoV-2 (proteína spike)	Nuvaxovid	NOVAVAX	2 Doses	4 semanas

Fonte: Tabela adaptada WHO, 2022.

Mesmo com o avanço da oferta de imunização mundial, as constantes descobertas de variantes têm chamado atenção das autoridades de saúde, devido ao crescimento exponencial de contaminados diariamente pelo SARS-CoV-2. Isso reforça que ainda são necessárias mais pesquisas para acompanhar as mutações que representam risco.

2.1.4 Bioquímica celular viral

O maquinário do vírus requer uma célula hospedeira para que ele possa se replicar. O SARS-Cov-2 apresenta habilidade a fim de reprogramar seu metabolismo de forma a favorecer e/ou acelerar a sua replicação e transmissão (Chazal e Gerlier, 2003; Novoa et al., 2005; To et al., 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta várias proteínas tendo destaque a proteína S, formada por espículas de glicoproteínas, que é responsável pela vinculação à membrana da célula hospedeira e receptores celulares como a ACE2 (enzima conversora de angiotensina 2) e a TMPRSS2 (protease transmembrana serina 2). Para transcrição e replicação de RNA (ácido ribonucleico) há envolvimento da

helicase e da RpRd (RNA dependente de RNA polimerase). A tradução e o processamento proteolítico envolvem as proteases *Main protein* (Mpro ou 3CLPro) e *Papain like* (PLpro) que são essenciais para replicação viral e progressão da doença (Ahsan et al., 2021; Liang et al., 2021; Freitas, Giovanetti e Alcantara, 2021; Wang et al., 2021).

2.2 Protease tipo cisteína

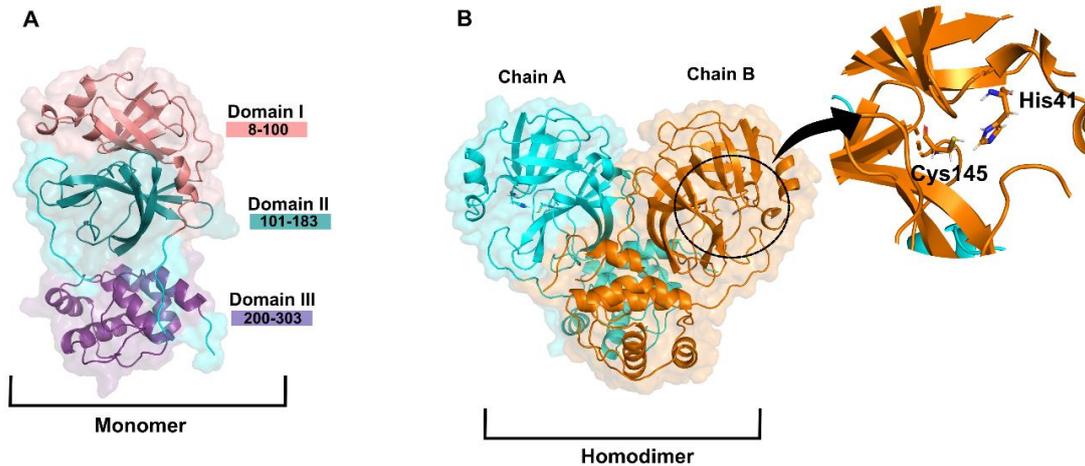
As proteases tipo cisteína são amplamente conhecidas por sua atividade relacionadas à degradação lisossomal das proteases de células do sistema imune, apoptose e processo de intrusão de células cancerígenas (Fernandes, 2011; Paiva-Oliveira et al., 2012; Ribeiro, 2018; Santos, 2007). Ainda são utilizadas na investigação de processos inibitórios de patologias como a esquistossomose (Bah et al., 2006). No SARS-CoV-2, a 3CLPro mostrou-se fundamental na replicação viral, além de manter sua estrutura conservada nas demais variantes.

O alvo do presente estudo é a 3CLPro ou (*Main Protein*), pois estudos já mostraram que é uma protease que mantém sua estrutura conservada nas demais variantes.

2.2.1 Protease principal (Mpro, do inglês, Main protease)

A *Main protein* (Mpro) apresenta três domínios (I, II e III), que são os principais protagonistas de clivagem e maturação (figura 2A). A unidade estrutural da Mpro é um homodímero, que possui dois protômeros e que se caracteriza por ser uma unidade estrutural (Ju et al., 2020; ou et al., 2020). Em cada protômero, há um sítio catalítico, cuja díade catalítica é composta por dois aminoácidos (Cisteína – Histidina) e se localiza entre os dois primeiros domínios. Ressalta-se que um resíduo em especial formado pela glicina é essencial ao posicionamento dos substratos. Um ponto de extrema importância é que a Mpro não apresenta homólogo humano, fazendo-se alvo viral viável (Dong et al., 2020; Wu et al., 2020; Zhang et al., 2020). A Mpro é uma candidata a alvo, pois apresenta características em suas estruturas que favorecem o acoplamento conciso com o ligante.

Figura 2 - Estrutura da Mpro (3CLpro).



Legenda: PDB id: 6M2N. Na figura 2A é mostrado os domínios que compõem o monômero. O monômero é formado por três domínios: o domínio I vai do resíduo 8-100; o domínio II, do resíduo 101-183 e o domínio III se estende do resíduo 200-303. A figura 2B mostra o homodímero formado pelas cadeias A e B e em destaque a díade catalítica Cys145-His41.
 Fonte: Adaptado de Tahir Ul Qamar e colaboradores (2020).

Através de conhecimentos relatados na literatura, que usam como alvos a proteína Mpro, até o presente momento, nenhum mostrou resposta expressiva. Estudos relatam a possibilidade de uso de componentes biológicos advindos de origem vegetal atuando na inibição das proteases (Ahmad et al., 2021; Gao et al., 2021).

2.3 Plantas e seus compostos químicos aplicados à saúde

Historicamente, a utilização das plantas é direcionada para alívio ou cura de doenças, sendo usadas em práticas tradicionais, por ser recurso natural acessível para muitas comunidades e grupos étnicos. Dessa forma, são obtidos conhecimentos sobre a manipulação de plantas com enfoque em suas propriedades de uso medicinal (Mourão et al., 2021).

Em países em desenvolvimento, as plantas são utilizadas como “medicamento natural” para suprir necessidades básicas de saúde, mais especificamente, o uso de extratos vegetais que compõem uma vasta porção da produção de medicamentos da indústria farmacêutica. Sendo assim, sua utilização é relevante em práticas integrativas que confluem para aprimoramento na atenção à saúde (Borges e Amorim, 2020).

Atrelados à segurança da utilização dessas práticas e aos métodos científicos que comprovem a eficácia das plantas medicinais e fitoterápicos, a Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), observou com interesse a abordagem dessa temática (Dias et al., 2020).

2.3.1 Nutracêuticos

O termo nutracêuticos é descrito como um arcabouço de componentes naturais que proporcionam benefícios à saúde e bem-estar. São classificados como compostos bioativos que estão presentes em alimentos. O termo nutracêutico é utilizado por cientistas a fim de utilizar o alimento com ação de medicamento, em referência ao que afirmava Hipócrates (460-370 AC): “Deixe o alimento ser o seu remédio e o remédio seu alimento” (Bezerra e Brito, 2020).

São notórios na literatura vários trabalhos que comprovam o efeito benéfico, inicialmente atuando em conjunto ao processo metabólico e no tratamento e prevenção de doenças (Bezerra e Brito, 2020; Andrade et al., 2020; Azevedo et al., 2020; Weinstein e Skinner, 2011).

De acordo com Freitas, Giovanetti e Alcantara (2021), a utilização de nutracêuticos apresenta uma boa opção para evitar e até tratar doenças de animais, sendo uma ferramenta natural, geralmente sem efeitos colaterais. Dessa forma, produz benefícios e é de fácil inclusão na rotina alimentar.

Partindo de levantamentos da literatura, há comprovação da boa funcionalidade celular fazendo uso de substâncias como os nutracêuticos para prevenção ou tratamento de doenças também associadas a uso de fármacos, pois os nutracêuticos atuam na homeostase celular a partir de suas propriedades antioxidantes (Fernandes, 2011).

Dentro desse grupo, a espécie utilizada na medicina chinesa é a *Ginkgo biloba L.* da família *Ginkgoaceae* das Gimnospermas, que há anos é relatada por suas comprovadas propriedades de eficácia e de seu extrato em doenças neurológicas, cardiovasculares, isquemias, nefropatias, entre outras (Gil et al., 2020; Rodríguez et al., 2007; Wu et al., 2020; Xiong et al., 2021).

2.3.2 *Ginkgo biloba* como fonte de nutracêuticos

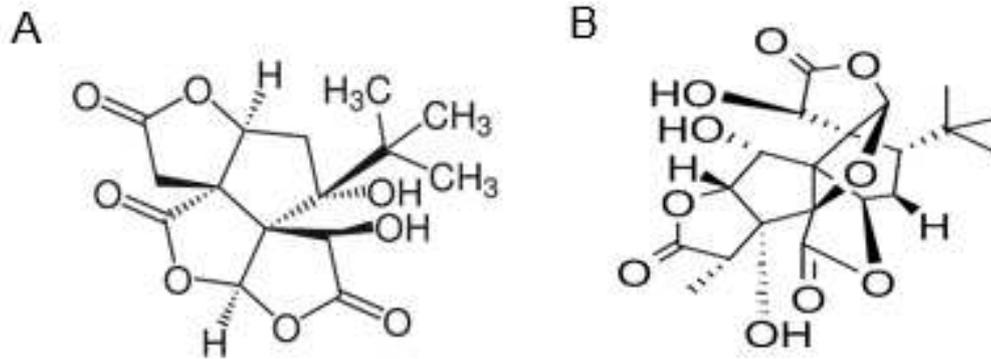
O conhecimento sobre as propriedades biológicas do *Ginkgo biloba* é que é uma planta de origem asiática e que pode chegar a 30 metros (Forlenza, 2003; Ibrahim, Ramadan e Mohammed, 2021). Culturalmente, essas plantas são usadas em infusões medicinais, alicerçadas por comprovações clínicas de seu uso. Seu extrato é rico em moléculas como flavonas, terpenos, flavonoides, sesquiterpenos, isoflavonas, flavan-3-ols, lactonas terpênicas, entre outros (Carmo Filho, Fakoury e Ferry, 2010).

Um dos representantes notáveis é o grupo das lactonas terpênicas, por sua ampla diversidade e por ser advindo de origem vegetal. Destacam-se como um grupo de moléculas de expressivo interesse, destacando-se suas atuações em mecanismos como a inibição do fator de necrose tumoral e inibição do fator de ativação plaquetária (PAF), redução de expressão proteica, inibição das proteases e as replicações do vírus HIV (Vírus da imunodeficiência adquirida) (Martínez-Solís et al., 2019; Ou et al., 2020; Yang et al., 2020).

A ação das lactonas terpênicas variam com as substituições que ocorrem em sua estrutura química com metilações, hidrogenações, hidroxilações, sulfatações (adição do íon sulfeto) dentre outras modificações. Uma característica muito interessante é a estabilidade desse composto diante do manuseio de alimentos que os contêm, pois resistem à oxidação, variações de temperatura e de pH (Almeida et al., 2020; Mourão et al., 2021; Paiva-Oliveira et al., 2012).

Os Bilobalídeos e Ginkogolídeos (exemplos nas figuras 3A e 3B) são conhecidos por exercerem efeitos biológicos em fisiopatologias, como o Alzheimer e outras demências (Andrade et al., 2020). Os bilobalídeos possuem atividade inibitória de doenças degenerativas neurológicas, apresentando também atividade inibitória de cascatas apoptóticas (Forlenza, 2003). Os Ginkogolídeos possuem ação vascular, atuando principalmente no endotélio de maneira direta facilitando perfusão arterial (Schneider, 2010).

Figura 3 - Na figura 3A temos o exemplo do bilobalídeo e 3B temos um exemplo de ginkgolídeo.



Fonte: elaboração própria.

Além das características citadas acima, o interesse econômico pelos flavonoides é explorado devido sua boa síntese sobre complexos biológicos, pois já são relatados efeitos antivirais, anti-hepatotóxico, antioxidante, anti-inflamatório e hiperlipidêmico. A importante atividade na inibição proteica e enzimática concerne com a pesquisa da possível atuação diante das proteínas do vírus SARS-CoV-2 (Yang et al., 2021).

São necessárias investigações a respeito de biomoléculas que atuem diretamente no maquinário celular do vírus em questão, pois podem trazer resultados indicativos para elaboração de uma possível terapia. Isso ocorre devido à busca por um agente terapêutico alternativo, pelo número de fármacos já desenvolvidos para outras patologias, bem como outras moléculas de origem vegetal sendo testadas e pelo fato de nenhuma terapia específica ter sido cientificamente aprovada com alta eficácia estimada (Bhowmick et al., 2020).

Dessa forma, diante dos fatos citados anteriormente, sua estabilidade e arranjo químico estrutural propõem que tais evidências possam nortear positivamente a experimentação.

2.4 Bioinformática estrutural aplicada ao desenvolvimento de medicamentos

Os métodos de simulação computacional de sistemas farmacológicos têm-se mostrado de grande importância no desenvolvimento racional de novos medicamentos e no reposicionamento de fármacos já existentes como Paxlovid (Nirmatrelvir e Ritonavir). Dentre as metodologias recentemente empregadas na

prospecção de agentes inibidores das proteínas viras do SARS-CoV-2, destacam-se: (i) o ancoramento molecular, focado na identificação inicial de compostos promissores; (ii) a dinâmica molecular, focada na análise da estabilidade e equilíbrio estrutural das proteínas alvo, bem como na estabilidade de complexos formados por pequenos compostos e proteínas; e (iii) os métodos de cálculo de energia de interação entre proteínas e pequenos ligantes (Shina, Tam e Wang, 2022).

No ancoramento molecular, também chamada docagem molecular, fornece possibilidades de ensaios de interação molecular, em que a direção e a conformação definirão a “pose” em que o ligante estará situado no receptor (Barreiro e Fraga, 2013; Rudrapal et al., 2022).

A dinâmica molecular é usada para o estudo do movimento do sistema: átomos e moléculas, bem como sua interação em função do tempo. As energias de interação entre as moléculas envolvidas no sistema ocorrem onde há forças newtonianas que podem ser repulsivas ou atrativas. O conhecimento estrutural a respeito de macromoléculas como proteínas permitem o entendimento de fenômenos biológicos como regulação enzimática, transporte através da membrana plasmática, leitura do DNA e a sua própria transcrição (Abraham et al., 2015. Hospital et al., 2015; Kneller et al., 2020; Namba, Silva e Silva, 2008).

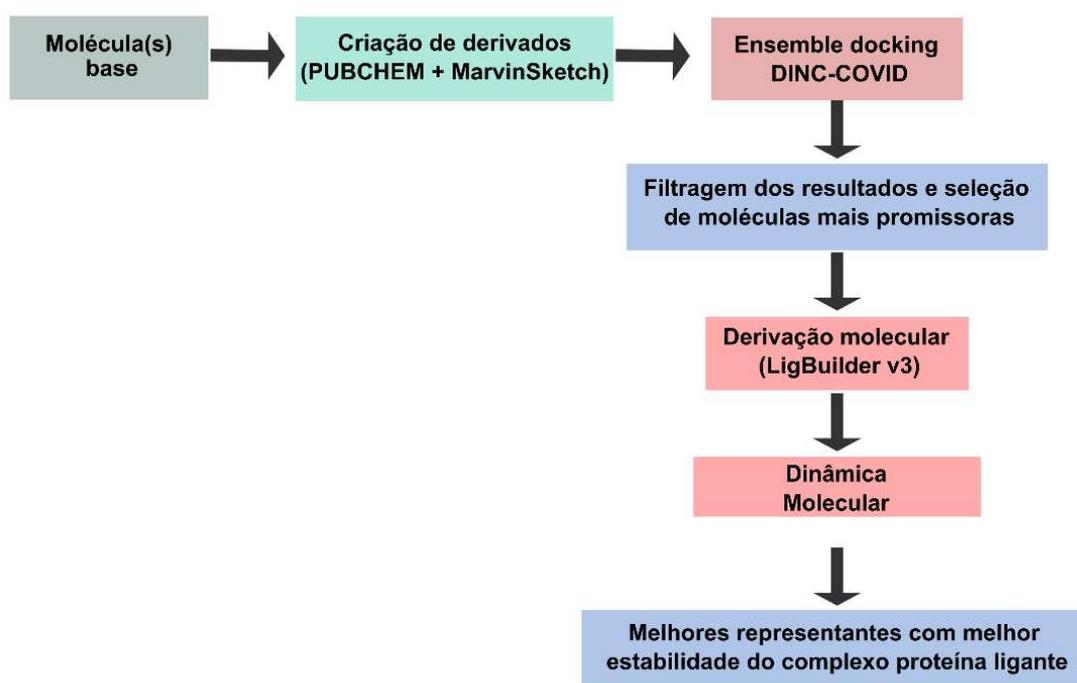
Os métodos de cálculo de energia de interação são utilizados para aferir as variações de energia, dispostos após a modelagem, são necessários para realizar comparações dessas energias obtidas, performando as energias livres e as demais interações em estudo (Fujitani et al., 2005).

Diante dessas postulações, a utilização de triagem virtual e simulações de ancoramento molecular servem como base para estudos e descobertas de novas moléculas com propriedades antivirais que venham a interagir com alvos biológicos no combate a doenças como HIV (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e a mais atual, a síndrome de COVID-19, mais especificamente com protease importante para o ciclo de replicação viral (Kouznetsova et al., 2020; Wang et al., 2020).

3 METODOLOGIA

As análises foram realizadas através de ancoramento molecular com múltiplas conformações proteicas (*Ensemble Docking*), seguida de análise de estabilidade de interação via dinâmica molecular e cálculos de energia livre de ligação. O fluxograma de realização do trabalho está representado na figura 4, enquanto os métodos utilizados serão descritos nos parágrafos que seguem.

Figura 4 - Fluxograma de desenvolvimento das simulações.



Fonte: elaboração própria.

3.1 Seleção de compostos e construção da biblioteca de derivados

A estrutura molecular dos compostos a serem estudados foram obtidos através da plataforma PubChem (Kim et al., 2020; Ragab et al., 2022). As modificações moleculares durante as etapas de proposição de derivados estruturais e a análise dos estados de protonação foram realizadas utilizando-se a ferramenta MarvinSketch da ChemAxon (Akanchise e Angelova, 2023).

3.2 Conjunto conformacional das proteínas alvo

Durante a realização deste projeto, foram utilizados conjuntos conformacionais das proteínas alvo produzidos e disponibilizados na plataforma DINC-COVID (<http://dinc-covid.kavrakilab.org>). Nessa plataforma, para cada proteína alvo, três conjuntos contendo distintas conformações do sítio de ligação estão disponíveis. Abaixo, estão descritos os três conjuntos conformacionais utilizados:

O primeiro conjunto de conformações é chamado de “Crystals” e foi obtido através da análise dos dados cristalográficos de 156 estruturas da Mpro, todos disponíveis na literatura.

O segundo conjunto de conformações é chamado de “Charmm” e foi obtido através da análise de 100 mil conformações de cada proteína, produzidas através de dinâmica molecular (dm) com o campo de força charmm36 (Jin et al., 2020).

O terceiro conjunto de conformações é chamado de “Gromos” e foi obtido através da análise de 100 mil conformações de cada proteína, produzidas através de dinâmica molecular (dm) com o campo de força gromos53a6 (Hansen et al., 2020).

Conforme reportado pelos autores, enquanto o conjunto de conformações Crystals representa a geometria do sítio de ligação em contato com inibidores já desenvolvidos (e, portanto, limitada ao espaço químico de tais inibidores), a geometria dos conjuntos Charmm e Gromos representam estados mais flexíveis do sítio de ligação, permitindo, assim, a exploração de moléculas com perfil químico distinto das atualmente estudadas (Wang et al., 2020). Ao total, durante a análise da interação de cada composto e seus derivados, foram testados a interação com 25 (Crystals), 14 (Charmm) e 11 (Gromos) conjuntos conformacionais da Mpro.

3.3 Ancoramento molecular com múltiplas conformações proteicas

As simulações de ancoramento molecular foram realizadas através da plataforma DINC-COVID, com pequenas modificações. Essa é uma plataforma de *meta-docking* baseada no mecanismo da plataforma DINC (<http://dinc.kavrakilab.org/>) e foi desenvolvida, especificamente, para prospectar modos de interação entre pequenos ligantes e peptídeo miméticos com proteínas do SARS-COV-2. Durante a etapa de *docking*, cada composto teste é posto a interagir com um conjunto distinto de conformações do sítio alvo, de forma a mimetizar diversos estados

conformacionais observados fisiologicamente. Para garantir a qualidade dos resultados, múltiplas repetições foram realizadas e os resultados foram pós-processados utilizando-se três funções de escore para o ranqueamento das poses obtidas. Os resultados obtidos para os três conjuntos conformacionais dos alvos foram avaliados conjuntamente, a fim de favorecer a melhor interação intermolecular (Falcon et al., 2019; Hall-Swan et al., 2021).

3.4 Desenho de derivados moleculares

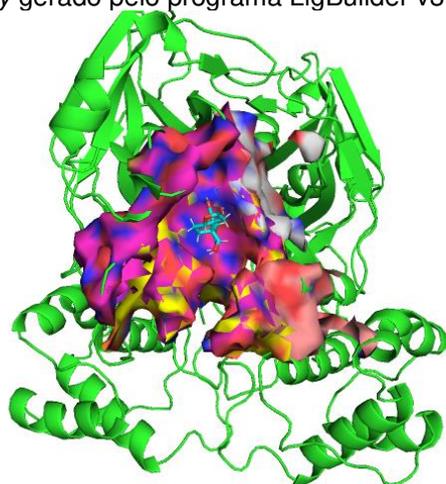
Neste trabalho, foi utilizado o programa LigBuilder versão 3.0. Esse programa utiliza o algoritmo genético lamarckiano para explorar o espaço geométrico da proteína alvo e produzir derivados moleculares de ligantes conhecidos (Agnihotri et al., 2012; Wang, Gao e Lai, 2020; Zhang, Yap e Altmeyer, 2005).

Inicialmente, são fornecidos dois arquivos ao sistema, um contendo a proteína alvo e outro o ligante conhecido, já posicionado espacialmente na cavidade proteica alvo. Ambos, a proteína e o ligante, devem já estar protonados corretamente. Em seguida, é indicado um ponto (átomo) do ligante, no qual o programa deverá ligar fragmentos moleculares orgânicos, previamente fornecidos, de forma a gerar derivados da molécula original. A cada ciclo, um conjunto de novas moléculas é gerado e elas são testadas quanto a sua afinidade de interação com o sítio alvo. Somente os melhores resultados são mantidos.

I) CAVITY: visa identificar todas as cavidades presentes na proteína alvo, bem como possíveis “sítios de ligação”.

Figura 5 - Ilustração do *cavity* gerado pelo programa LigBuilder v3.

A



Fonte: elaboração própria.

II) BUILDING: deve ser utilizada após a funcionalidade CAVITY, uma vez que se utiliza das cavidades identificadas para promover o crescimento de fragmentos moleculares a partir dos ligantes fornecidos (Vlachakis et al., 2013). Com a obtenção de novos compostos químicos, o programa irá construir uma biblioteca com gerações de novas estruturas (Wang, Gao e Lai, 2000; Yuan, Pei e Lai, 2020). Assim, os cálculos de derivação irão prosseguir em dois terminais distintos.

3.5 Simulações de estabilidade do complexo proteína-inibidor

A fim de avaliar a estabilidade da ligação com o sítio das proteínas alvo, os principais compostos identificados durante a etapa de *ensemble docking* foram submetidos às simulações de dinâmica molecular (Braz et al., 2022).

Durante as simulações, será utilizado o campo de força Amber99SB e, para apurar a flexibilidade da proteína, serão usados o pacote GROMACS 2019. A simulação será realizada em duplicata e consistirá em, aproximadamente, ~370.000 átomos que incluíram o sistema Mpro, 150.000 moléculas de água, 350 íons Na⁺ e 340 íons Cl⁻ (Abraham et al., 2015; Van der Spoel et al., 2005). Antes de prosseguir com a dinâmica molecular, será realizada a minimização total de energia por um conjugado de algoritmos. A seguir, será utilizado o PME (*Particula Mesh Ewald*) para modelagem do alcance da eletrostática, temperatura pelo *Nose-Hoover* em 310 K e o *Parrinello-Rahman* barostat com a pressão de referência de 1 bar e uma compressão de $4,5 \times 10^{-5}$ /bat para controle de pressão. As ligações covalentes serão reduzidas pelo algoritmo LINCS (Berendsen, 2007; Deserno e Holm, 1998; Hess, 2008; Hess et

al., 1997). As próximas etapas integrarão todas as simulações definidas em duas fases. Por fim, serão obtidas duas trajetórias de 300 ns (nanossegundos).

Como parâmetro de estabilidade estrutural, foi utilizada a análise do desvio médio quadrático da raiz (RMSD). As simulações somente serão interrompidas quando for observada a estabilização ou o desprendimento (ou tendência clara ao desprendimento) do candidato a inibidor (Abe et al., 2022).

3.6 ADME

Como forma de caracterização farmacocinética, serão realizadas análises de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) dos compostos identificados como promissores (Iksen et al., 2023). Os cálculos foram realizados com o auxílio do servidor *SwissADME*, o qual fornece mais de 46 descritores para cada molécula analisada (Alamri et al., 2020).

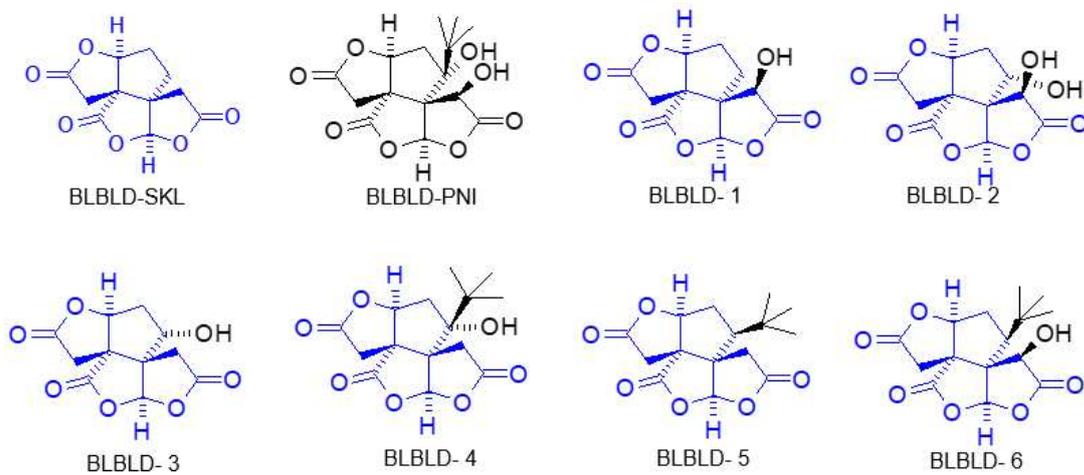
3.7 Visualização dos resultados e produção de imagens

As análises visuais dos complexos formados e a criação de imagens para publicação serão realizadas tanto com o auxílio da ferramenta *DiscoveryStudio Visualizer* BIOVIA versão 2021 (DS), quanto do PyMol (<https://pymol.org/2/>). O programa *Inkscape* será utilizado para a formatação final das imagens (Azevedo et al., 2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

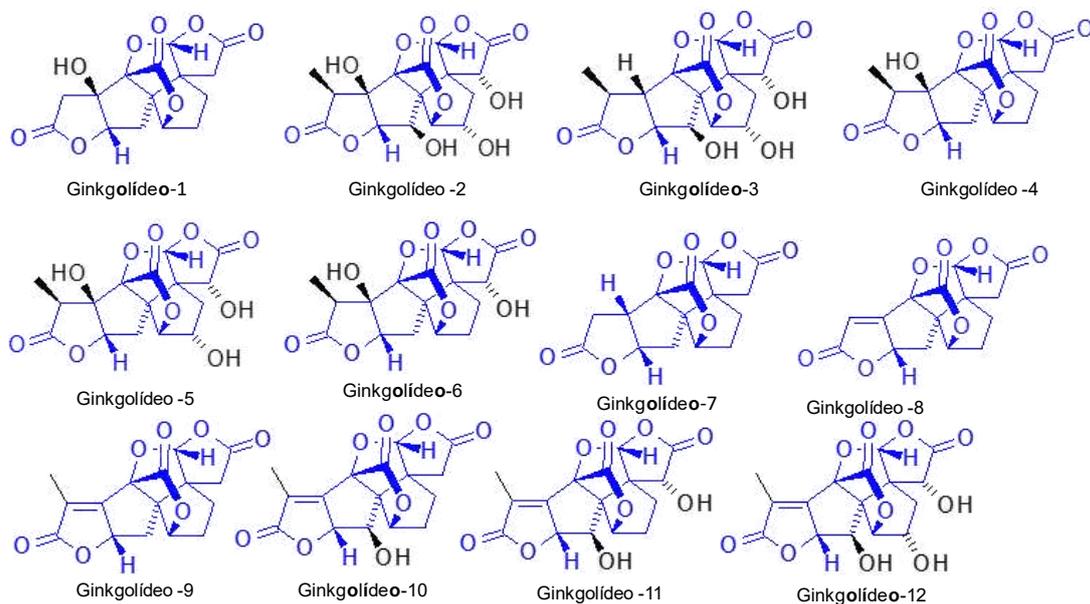
Neste trabalho, simulações computacionais foram empregadas para testar o perfil de interação de derivados do Gingko biloba - bilobalídeos (BLBLD) e ginkgolídeos (GINKGD) - com o sítio catalítico (local de ligação) da protease principal (Mpro) do SARS-CoV-2. Inicialmente, utilizando a estrutura química do produto natural BLBLD, foi criado um conjunto de sete derivados (Figura 6A). O mesmo procedimento, utilizando a estrutura química do produto natural GINKGD, deu origem a um conjunto de 14 derivados (Figura 6B).

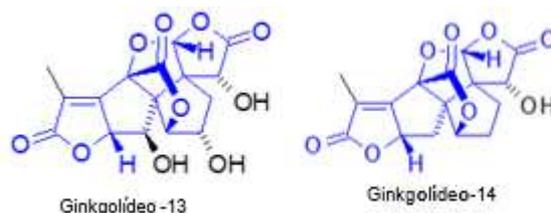
Figura 6A - Bilobalídeos



Fonte: elaboração própria.

Figura 6B - Ginkgolídeos.





Fonte: elaboração própria.

4.1 Interação entre BLBLD, GINKGD e Mpro

Para melhor avaliar a capacidade de interação de cada um dos bilabolídeos e ginkgnolídeos (aqui chamados de ligantes), foi utilizada a técnica de atracamento molecular baseada em conjuntos conformacionais do alvo (em inglês, *ensemble docking*). Nessa técnica, cada ligante foi testado contra um conjunto de conformações estruturais (também chamado de estados conformacionais) da proteína Mpro do SARS-CoV-2. A ferramenta utilizada foi o servidor web DINC-COVID, o qual possui três conjuntos conformacionais para essa proteína (contendo 25, 14 e 11 estados conformacionais, respectivamente), cada qual representando um grau de flexibilidade distinto para o sítio alvo. Ao final do processo de atracamento molecular, a energia de interação individual de cada ligante com cada um dos estados conformacionais da Mpro foi avaliada através das funções de pontuação Vina, Vinardo e AD4. Interessantemente, em cada caso, as três melhores energias de interação para cada função de pontuação representaram a mesma conformação do ligante (pose) no sítio alvo. Dado que, o mecanismo de busca utilizado no servidor DINC-COVID baseia-se no software Vina, neste estudo, foram utilizados somente os resultados obtidos através da função de pontuação Vina durante as análises que se seguiram ao atracamento. Os resultados são listados na tabela 2 e 3.

A análise detalhada dos nossos dados reflete a flexibilidade inerente, já reportada, do sítio catalítico da Mpro. Tal flexibilidade, talvez, seja um dos responsáveis pela grande dificuldade encontrada após anos do início da pandemia em desenvolver-se inibidores estáveis.

Tabela 2 - Tabela com os melhores resultados dos bilabolídeos em pontuação de score.

Ligante	Energia (kcal/mol)	Vina score				
		Alvo	Energia (kcal/mol)	Alvo	Energia (kcal/mol)	Alvo
BLBLD-PNI	-7,81	5rh9_aligned	-7,78	3CLpro_charmm_cluster_7	-7,83	3CLpro_gromos_cluster_8

BLBL D-SKL	-7,51	5rh9_alig ned	-7,44	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,04	3CLpro_gromos_clu ster_5
BLBL D-D1	-7,86	5rh9_alig ned	-7,88	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,36	3CLpro_gromos_clu ster_10
BLBL D-D2	-7,94	5rh9_alig ned	-8,17	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,63	3CLpro_gromos_clu ster_5
BLBL D-D3	-7,61	5rh9_alig ned	-7,81	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,50	3CLpro_gromos_clu ster_10
BLBL D-D4	-7,67	5rh9_alig ned	-7,87	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,56	3CLpro_gromos_clu ster_8
BLBL D-D5	-7,55	5rh9_alig ned	-7,53	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,09	3CLpro_gromos_clu ster_8
BLBL D-D6	-7,22	5rf5_alig ned	-7,54	3CLpro_charmm_clu ster_7	-7,59	3CLpro_gromos_clu ster_8

Fonte: elaboração própria.

Tabela 3 - Tabela com os melhores resultados dos ginkgolídeos em pontuação de score.

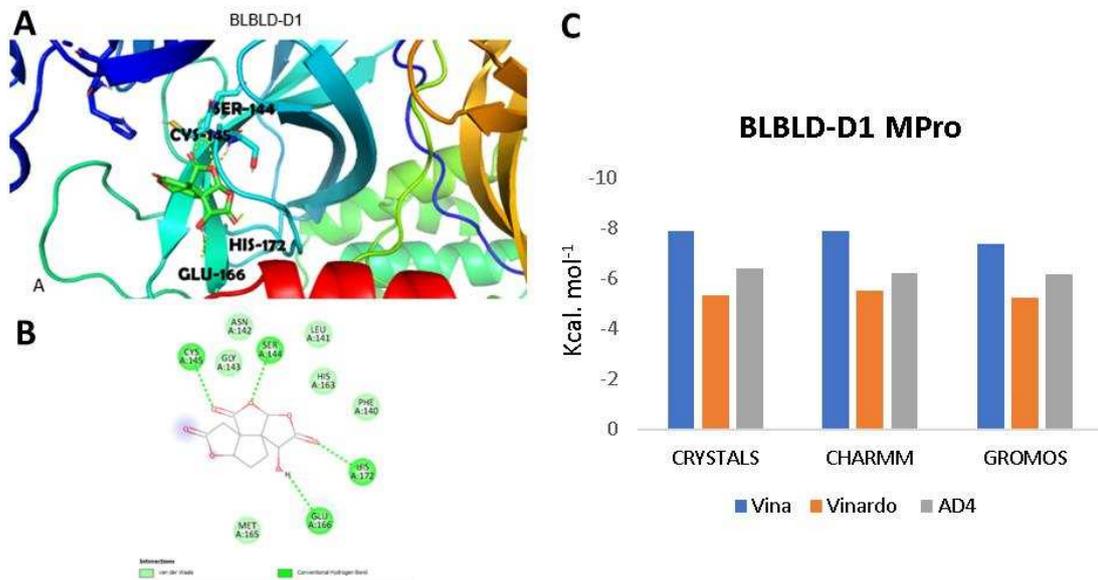
Vina score						
Ligante	Energia (kcal/mol)	Alvo	Energia (kcal/mol)	Alvo	Energia (kcal/mol)	Alvo
GINKG D-1	-8.72	6xb0_alig ned	-8.08	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.31	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-2	-9.37	6xb0_alig ned	-9.28	3CLpro_charmm_cl uster7	-9.61	3CLpro_gromos_clu ster_8
GINKG D-3	-9.07	6xb0_alig ned	-9.29	3CLpro_charmm_cl uster7	-9.05	3CLpro_gromos_clu ster_8
GINKG D-4	-8.75	6xb0_alig ned	-8.42	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.56	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-5	-9.00	6xb0_alig ned	-9.06	3CLpro_charmm_cl uster7	-9.29	3CLpro_gromos_clu ster_8
GINKG D-6	-8.96	5re9_ aligned	-8.91	3CLpro_charmm_cl uster7	-9.01	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-7	-7.97	5rfh_ aligned	-7.94	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.55	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-8	-8.71	6xb0_alig ned	-8.19	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.54	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-9	-8.81	6xb0_alig ned	-7.95	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.26	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-10	-8.98	6xb0_alig ned	-8.56	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.49	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-11	-9.07	6xb0_alig ned	-8.82	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.82	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-12	-9.07	6xb0_alig ned	-8.83	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.83	3CLpro_gromos_clu ster_5
GINKG D-13	-9.55	6xb0_alig ned	-9.43	3CLpro_charmm_cl uster7	-9.04	3CLpro_gromos_clu ster_8
GINKG D-14	-9.17	6xb0_alig ned	-8.52	3CLpro_charmm_cl uster7	-8.36	3CLpro_gromos_clu ster_5

Fonte: elaboração própria.

Buscando a melhor compreensão do mecanismo de ligação de cada um dos bilabolídeos e ginkgolídeos, foi realizada a inspeção visual do modo de ligação obtido durante o *ensemble docking*. Nas figuras que seguem, são apresentadas as

melhores poses de cada um dos ligantes, bem como a distribuição individual de energia obtida através do *ensemble docking*.

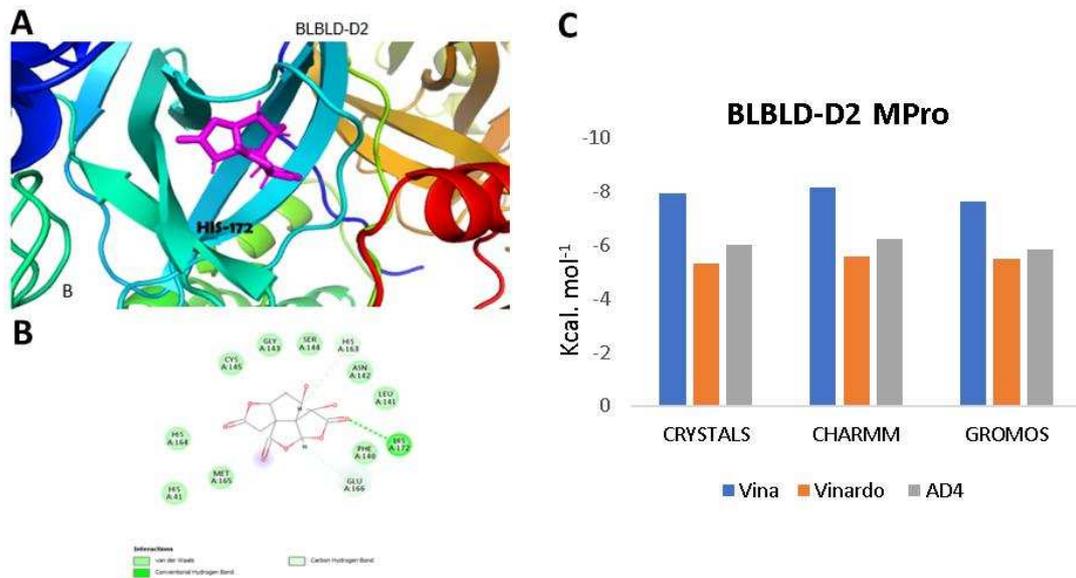
Figura 7 - Interação molecular dos Bilobalídeos BLBLD-D1 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 7A, observamos a geometria do ligante BLBLD-D1 no sítio da Mpro (energia calculada: -7,88 kcal/mol). Nela, podemos observar as interações do tipo ligação de hidrogênio formadas entre o ligante e os resíduos cisteína (CYS-145), serina (SER-144), histidina (HIS-172) e glutamato (GLU-166). Estudos corroboram os dados obtidos sinalizando, positivamente, com suas propriedades a presença da interação da molécula sítio catalítico enzimático podendo contribuir para a fosforilação enzimática e atuando diretamente nas proteases das vias de sinalização celular diante da disposição espacial dos aminoácidos dispostos no sítio em estudo (Kawakami et al., 2022; Nawrot et al., 2022; Niu, Yuan e Liu, 2022).

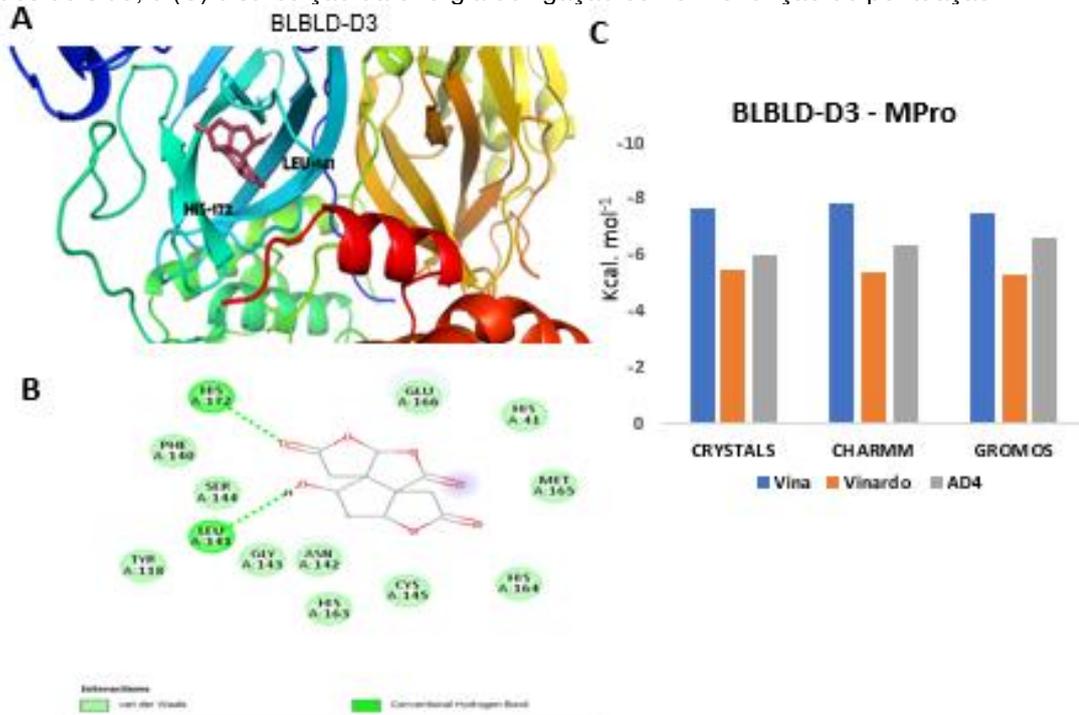
Figura 8 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-D2 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 8A, observa-se a geometria do ligante BLBLD-D2, que faz interação do tipo ligação de hidrogênio com o resíduo histidina (HIS-172) (figura 8B). A distribuição da energia de ligação, indicando uma força de $-8,17$ kcal/mol é exibida na figura 8C. A partir das interações dos ligantes com o alvo molecular após *docking* molecular, é possível investigar as interações do ligante com os resíduos, seguindo a pontuação da energia de ligação na função de score Vina. Este ligante apresentou boa afinidade com o alvo e atua sinergicamente no fator de ativação plaquetária, sendo assim, um candidato promissor às próximas etapas (Iksen et al., 2023).

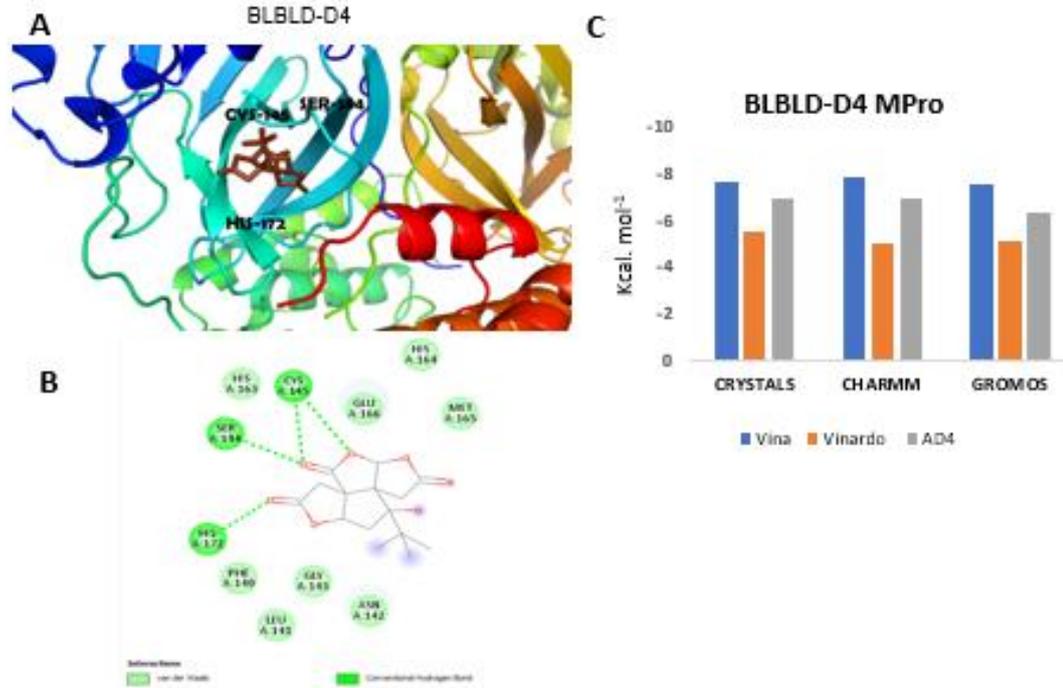
Figura 9 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-D3 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 9A mostra o ligante BLBLD-D3 no sítio da Mpro. Conforme destacado na figura 9B, o BLBLD-D3 forma ligações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172) e leucina (LEU-141) e sua melhor energia de interação calculada foi de -7,81 kcal/mol, conforme mostrado em 9C. Apresenta energia pouco inferior, mas interações interessantes que medeiam a supressão de ação neuro inflamatória que vem atuar na mecânica molecular auxiliando no rastreo de um possível inibidor (Bana, Rizvi e Ahmed, 2021; Liu, Jia e Zhang, 2023; Theoharides, 2022).

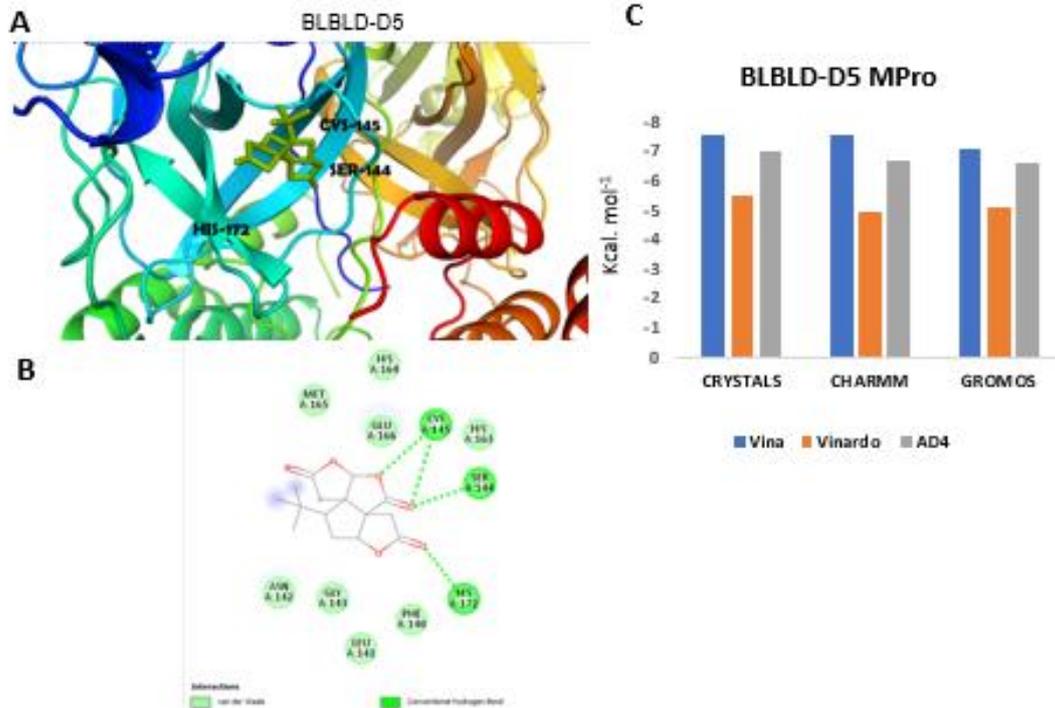
Figura 10 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-D4 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Conforme exibido na figura 10A, o ligante BLBLD-D4 orienta-se próximo à cisteína 145, resíduo crítico para a catálise. Note, na figura 10B, que, dentre as principais interações do BLBLD-D4, estão os resíduos cisteína (CYS-145), serina (SER-144) e histidina (HIS-172). Conforme representado na figura 10C, BLBLD-D4 apresenta uma energia de interação com a Mpro de -7,87 kcal/mol. Apresenta interações importantes como o resíduo de (CYS-145) que compõe papel crucial na catálise enzimática atuando na resposta imune, desse modo, apresentando uma possível atuação nas vias do ciclo celular viral (Shaghghi, 2020).

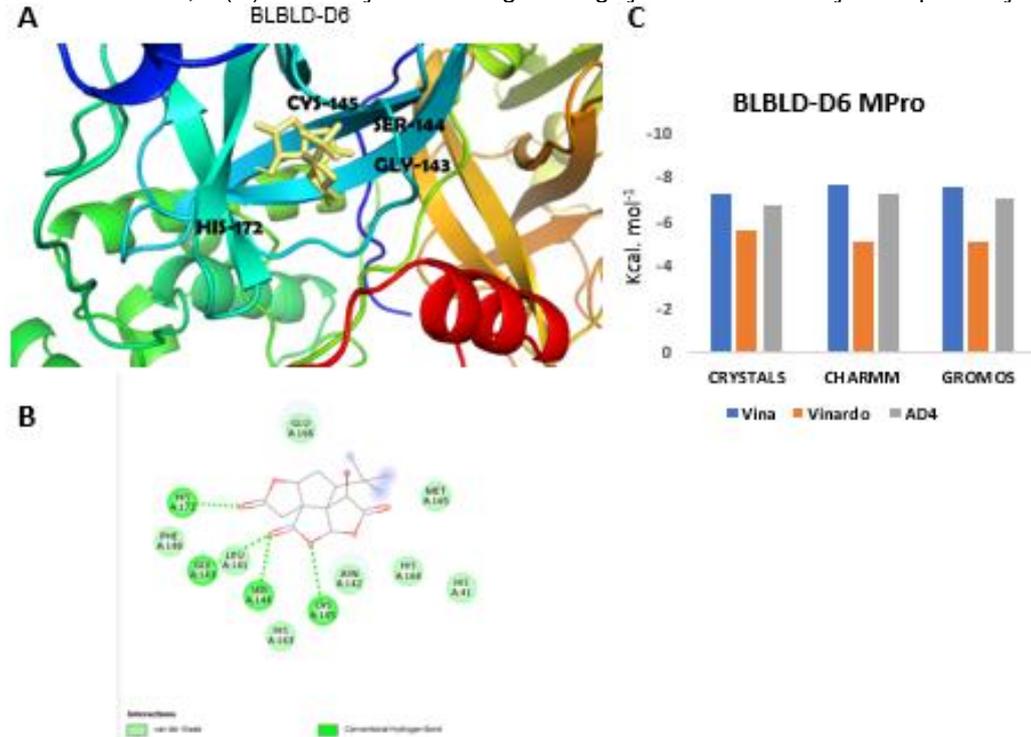
Figura 11 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-D5 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

O ligante da figura 11A é o BLBLD-5, que apresenta interações de hidrogênio com os resíduos cisteína (CYS-145), serina (SER-144) e histidina (HIS-172), interagindo com apenas um resíduo da díade catalítica (figura 11B). Sua melhor energia, na função de pontuação Vina, foi de -7,55 kcal/mol, conforme mostrado na figura 11C. Este possui uma boa interação com o resíduo de (CYS-145), fundamental na catálise enzimática, inativando o sítio e corroborando para a finalidade do estudo de predição de um inibidor (Xiong et al., 2021).

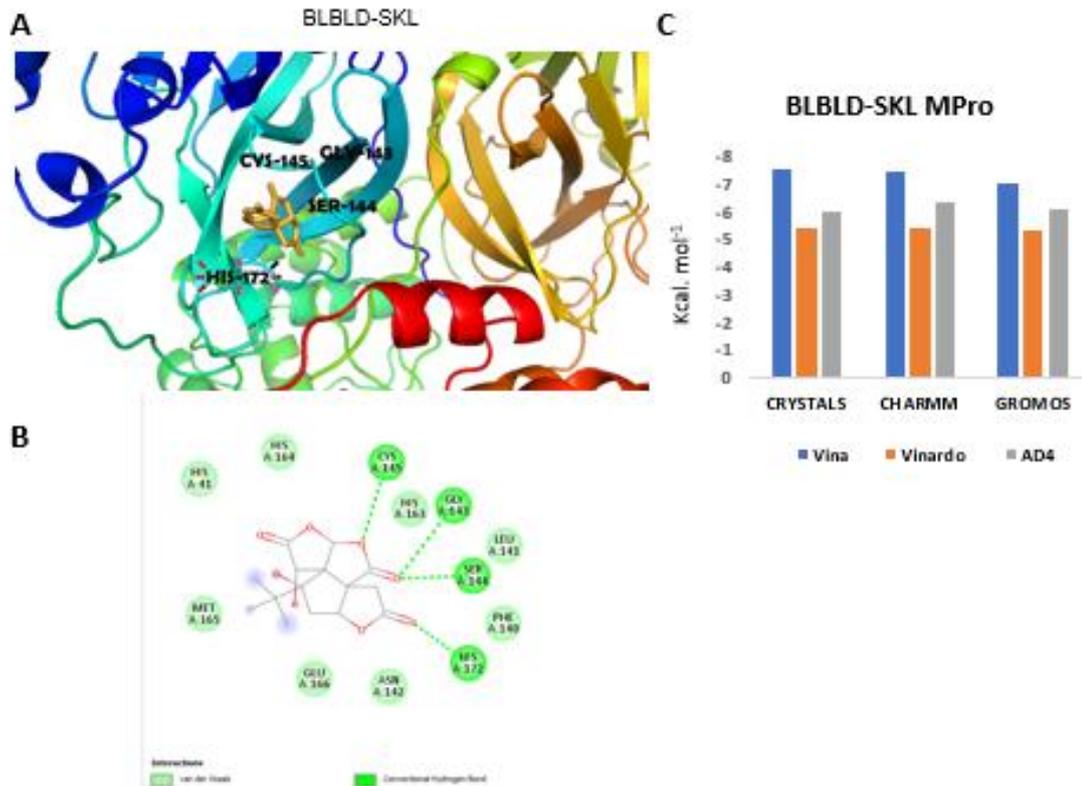
Figura 12 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-D6 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

O ligante da figura 12A é o BLBLD-D6 como sítio catalítico da Mpro. Conforme observado em 12B, esse ligante apresenta interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143), serina (SER-144) e cisteína (CYS-145), apresentando, pelo menos, uma interação com o resíduo da díade catalítica, podendo, assim, inibir a atividade da protease e bloqueando seu sítio catalítico (Kneller et al., 2020; Li, Luan e Zhang, 2020). Na figura 12C, observa-se que a melhor energia de interação, na função de score Vina, foi de -7,59 kcal/mol.

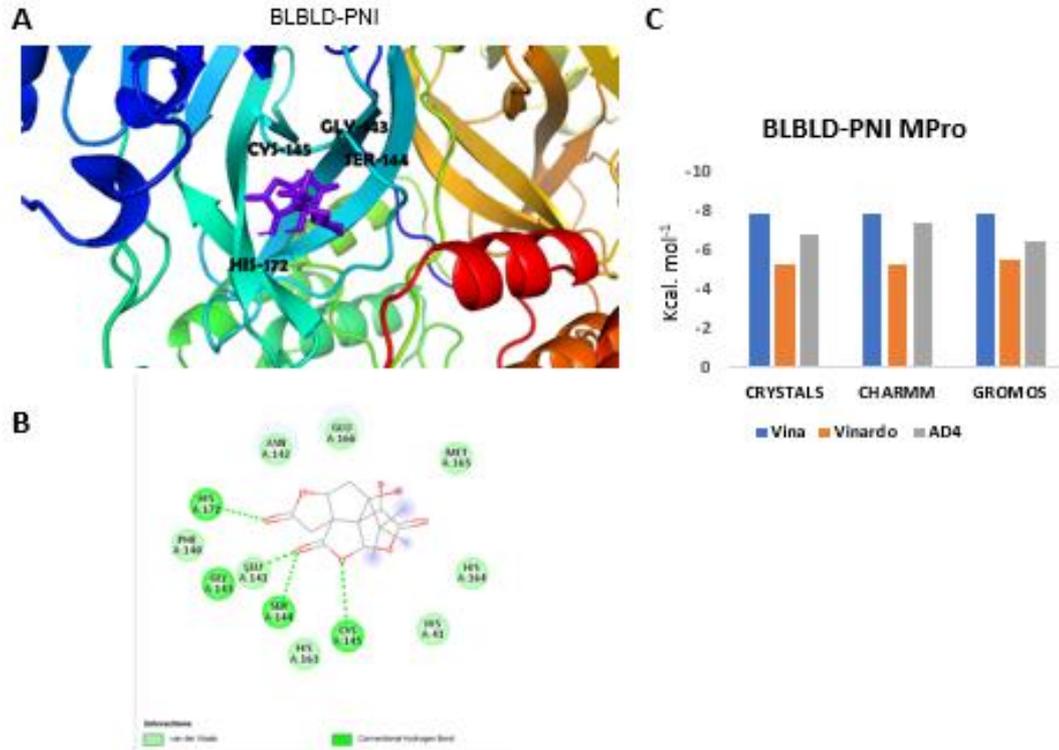
Figura 13 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-SKL com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 13A, observa-se o perfil de interação do ligante BLBLD-SKL no sítio de ligação da Mpro. Conforme observado na figura 13B, as principais interações do ligante BLBLD-SKL foram com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143), serina (SER-144) e cisteína (CYS-145), e a melhor energia de interação (figura 13C) foi de -7,51 kcal/mol, na função de score Vina. Apresenta boa interação com o resíduo de (CYS-145), que compõe a díade catalítica, mesmo sua energia de interação sendo inferior aos demais já citados. Suas interações eletrostáticas são favoráveis podendo atuar na ubiquitinação e na prevenção da replicação viral (Zhang et al., 2022).

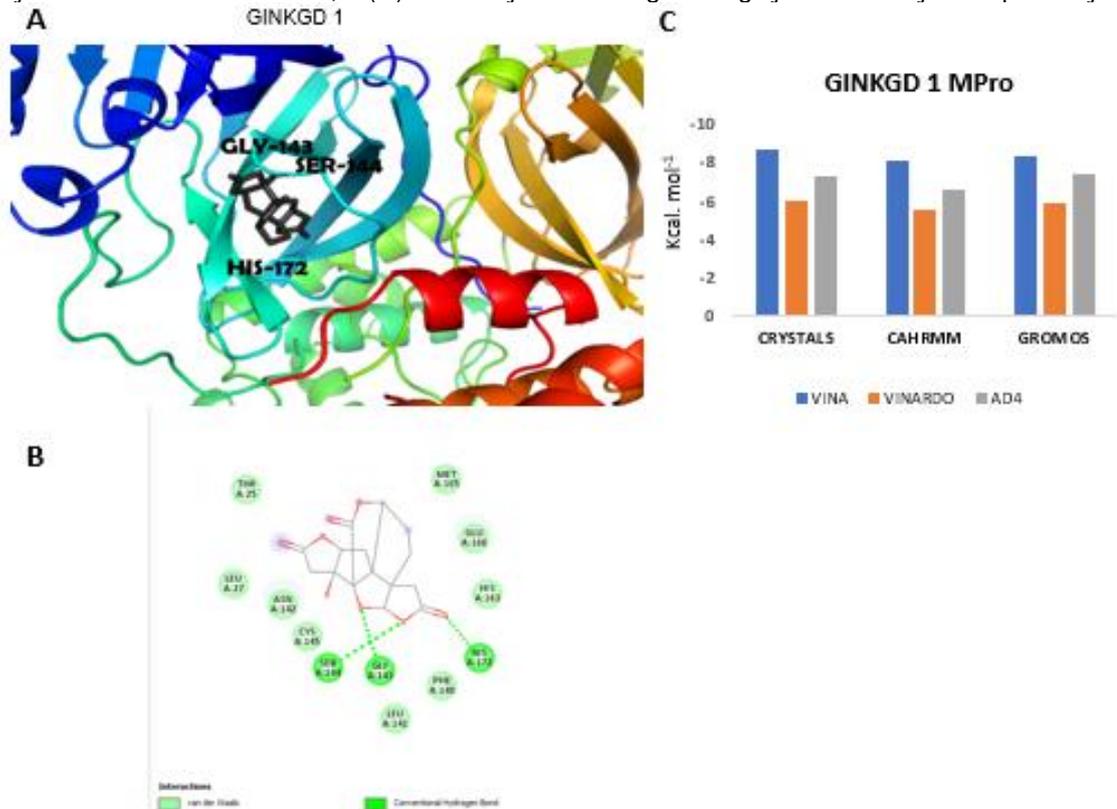
Figura 14 - Interação molecular dos Bilobalídeo BLBLD-PNI com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 14A mostra o perfil de interação do ligante BLBLD-PNI no sítio de ligação da Mpro. As principais interações do ligante BLBLD-SKL com os resíduos histidina (HIS-172), leucina (Leu-141), serina (SER-144) e cisteína (CYS-145) são exibidas na figura 14B. A melhor energia de interação foi de -7,83 kcal/mol, na função de pontuação Vina, como visto na figura 14C. Possui interações importantes com resíduos de interesse, como o (CYS-145), atuando diretamente na interrupção da replicação viral mediante essa ligação de hidrogênio com o resíduo (Liu et al., 2021).

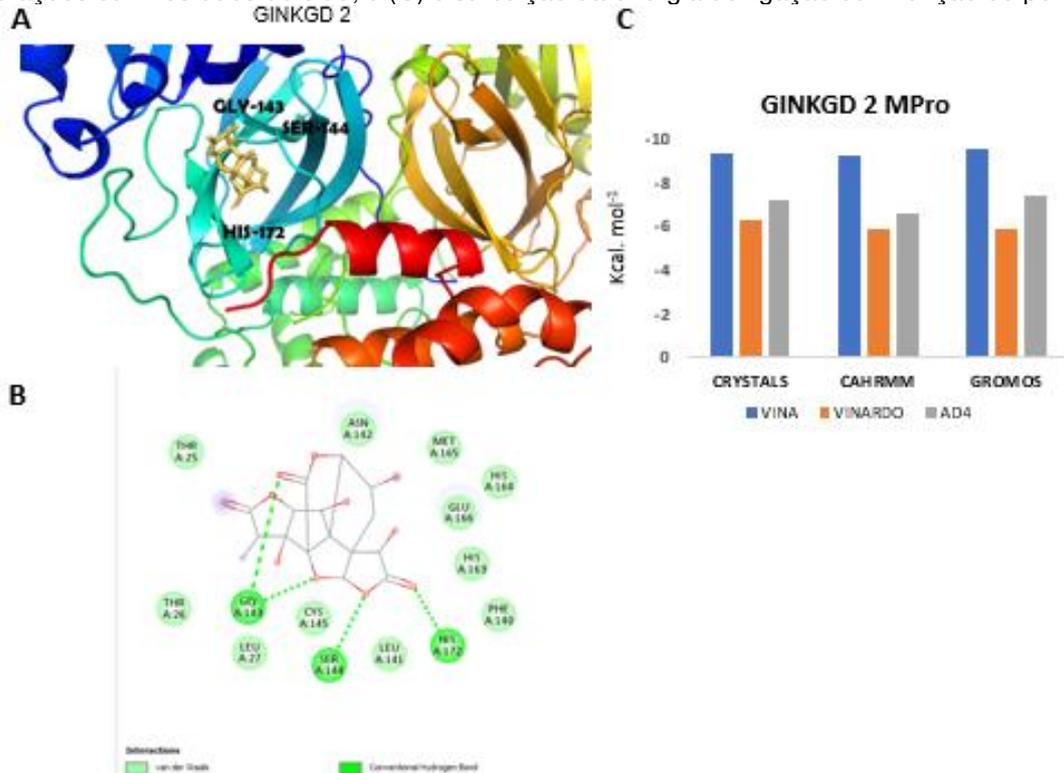
Figura 15 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D1 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação com função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 15A possui o ligante GINKGD-D1 no sítio de ligação da Mpro. Já a figura 15B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144), suas melhores. Conforme observado no gráfico da figura 15C, a melhor energia de interação foi de -8,57. Apesar de boa energia de interação, não apresenta interação com resíduos de interesse.

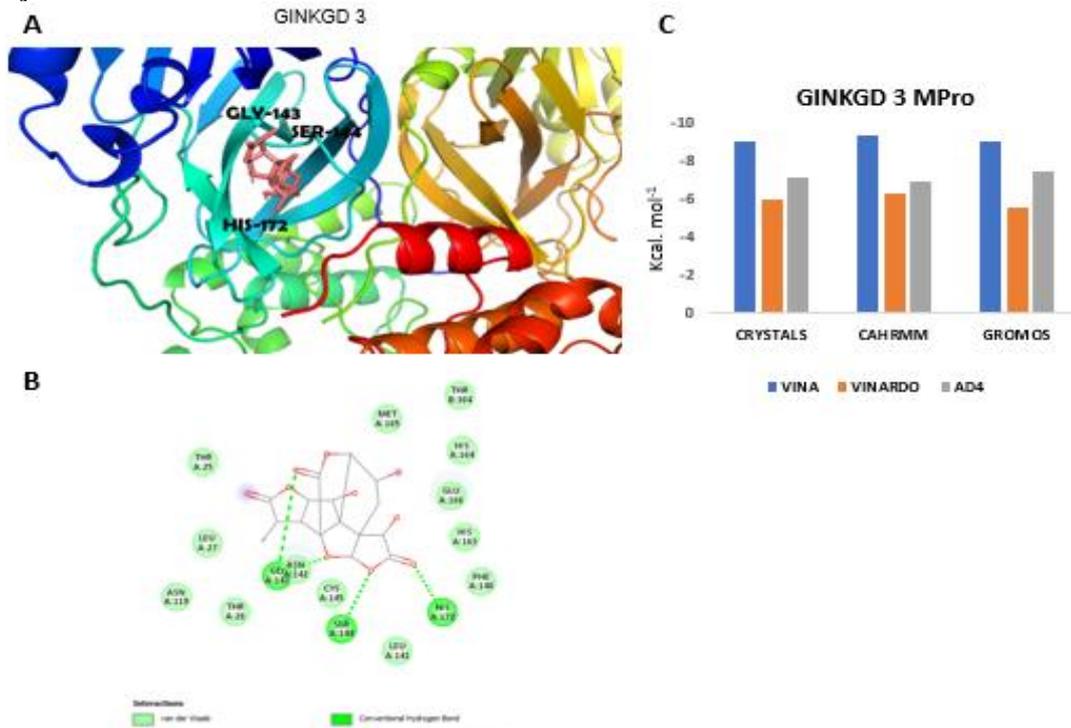
Figura 16 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D2 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação com função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 16A possui o ligante GINKGD-D2 no sítio de ligação da Mpro. Já a figura 16B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme observado no gráfico da figura 16C, a melhor energia de interação foi de -9,61. Apresenta uma ótima energia de interação, no entanto, não faz ligações com os resíduos de interesse.

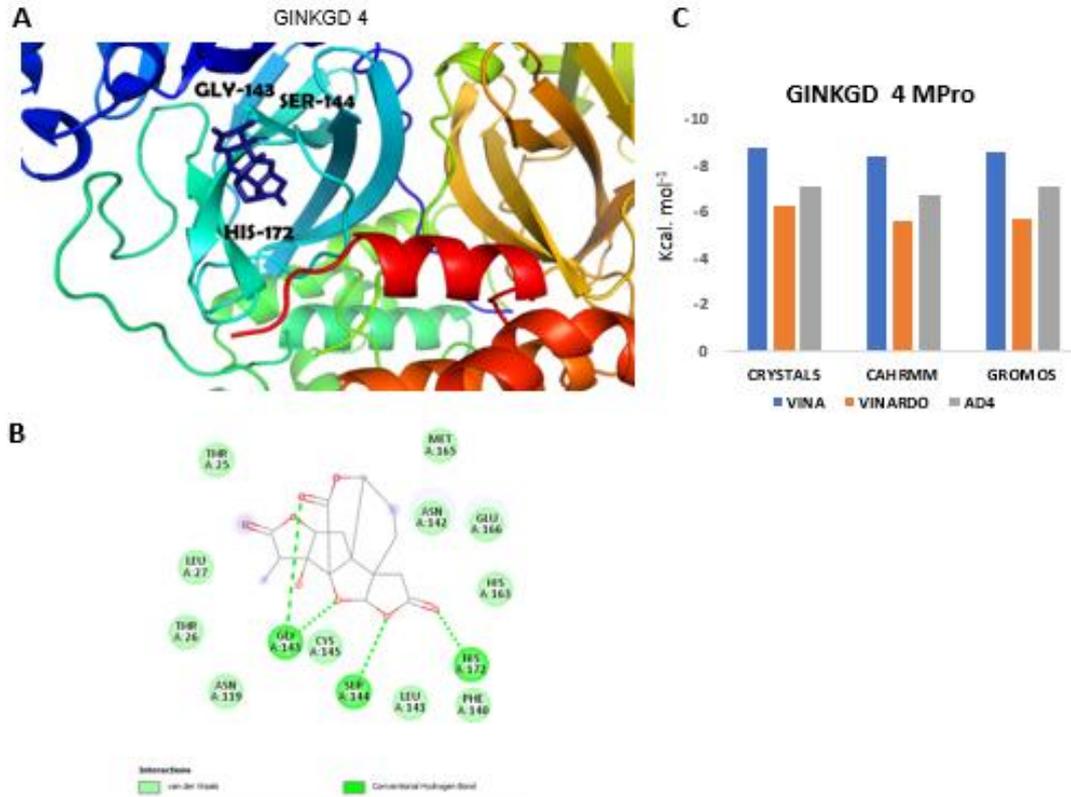
Figura 17 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D3 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 17A, com o seguinte ligante GINKGD-D3 no sítio de ligação da Mpro. Já na figura 17B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos: histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144) Conforme observado no gráfico 17C, a melhor energia de interação foi de -9,29. Apresenta boa energia e interação, mas não apresenta ligação com resíduos de interesse.

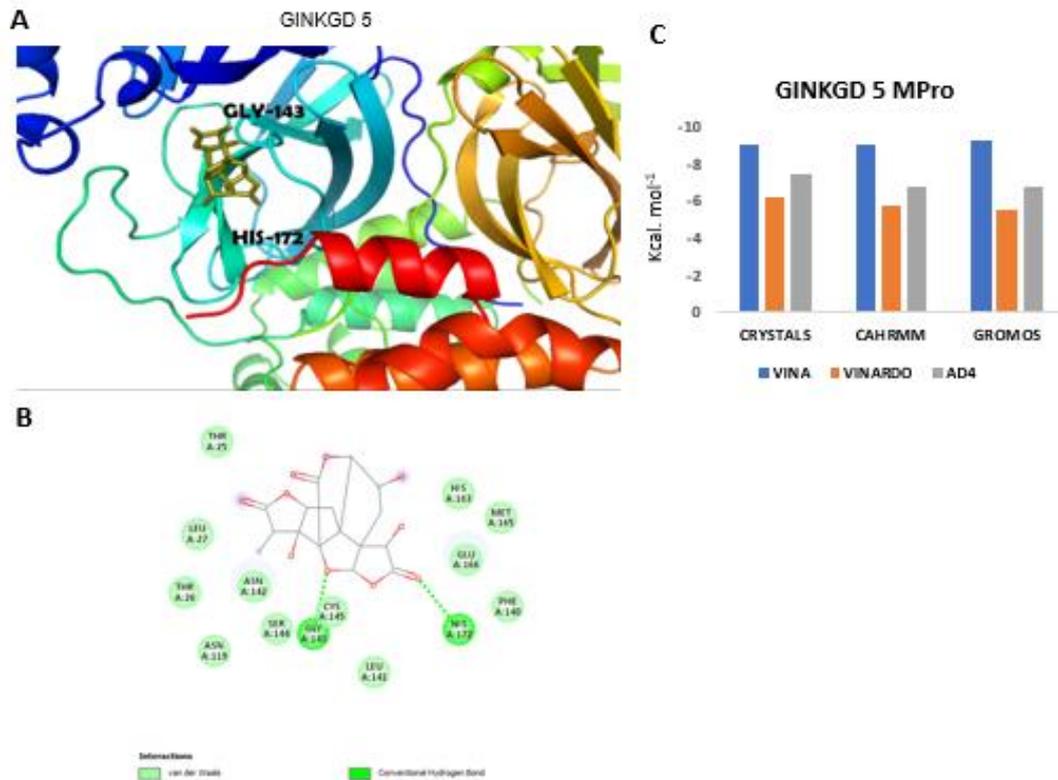
Figura 18 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D4 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 18A possui o ligante GINKGD-D3 no sítio de ligação da Mpro. A figura 18B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme o gráfico da figura 18C, a melhor energia de interação foi de -8,56 na função de score Vina. Esse ligante não apresentou interação com nenhum resíduo que compõe a díade catalítica e, apesar da energia atrativa, o posicionamento geométrico não o favorece como candidato a inibidor.

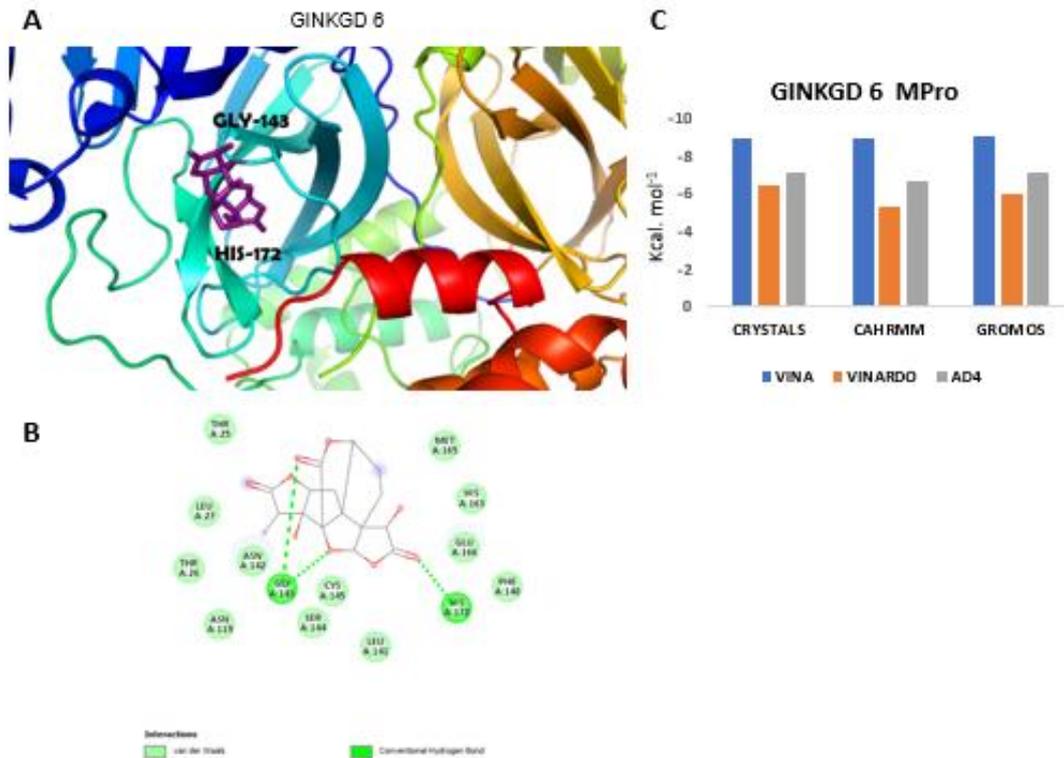
Figura 19 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D5 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação com função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 19A apresenta os ligantes GINKGD-D5. A figura 19B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos: fazem interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172) e glicina (GLY-143). Sua melhor energia foi -9,29 kcal/mol na função de score Vina. Esse ligante também não apresentou nenhuma interação com resíduo da díade catalítica. Mesmo apresentando energia significativa, suas interações não os promovem com interações de interesse.

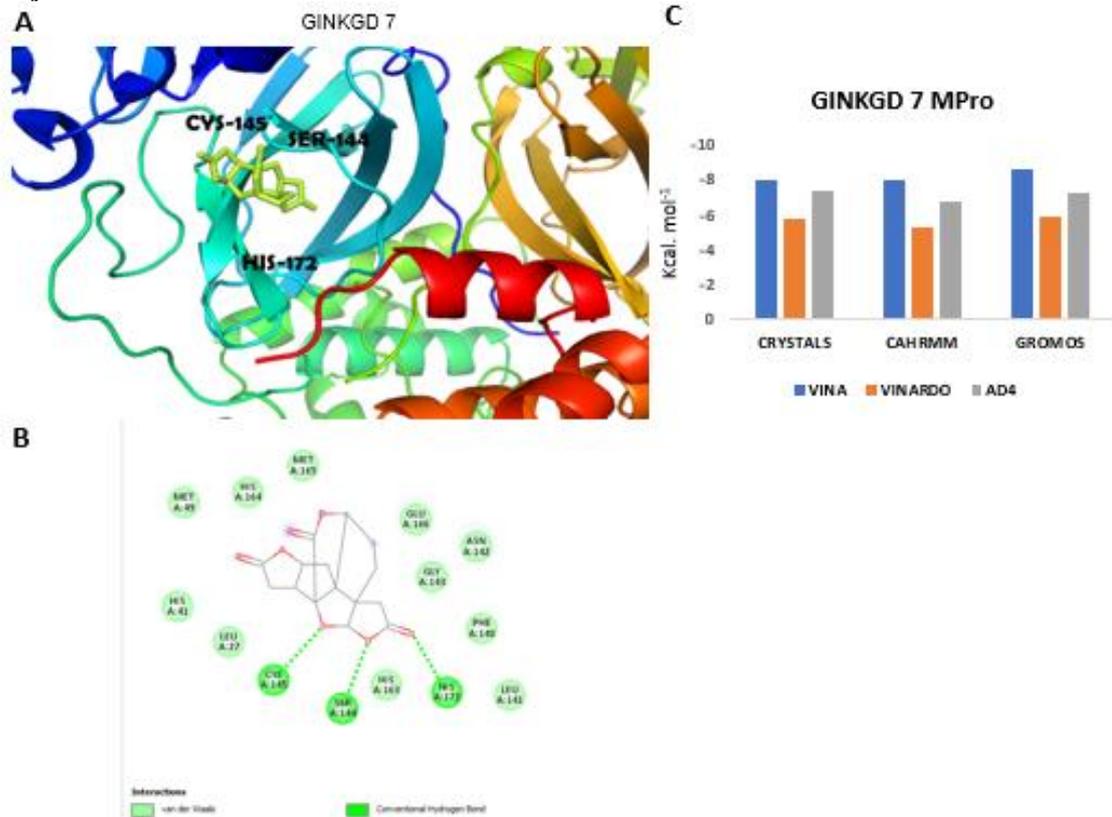
Figura 20 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D6 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 20A apresenta os ligantes GINKGD-D6. A figura 20B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos: fazem interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172) e glicina (GLY-143). Sua melhor energia foi -9,01 kcal/mol na função de score Vina. Esse ligante não apresentou nenhuma interação com resíduo da díade catalítica. Mesmo apresentando energias significativas, suas interações não os promovem com interações de interesse.

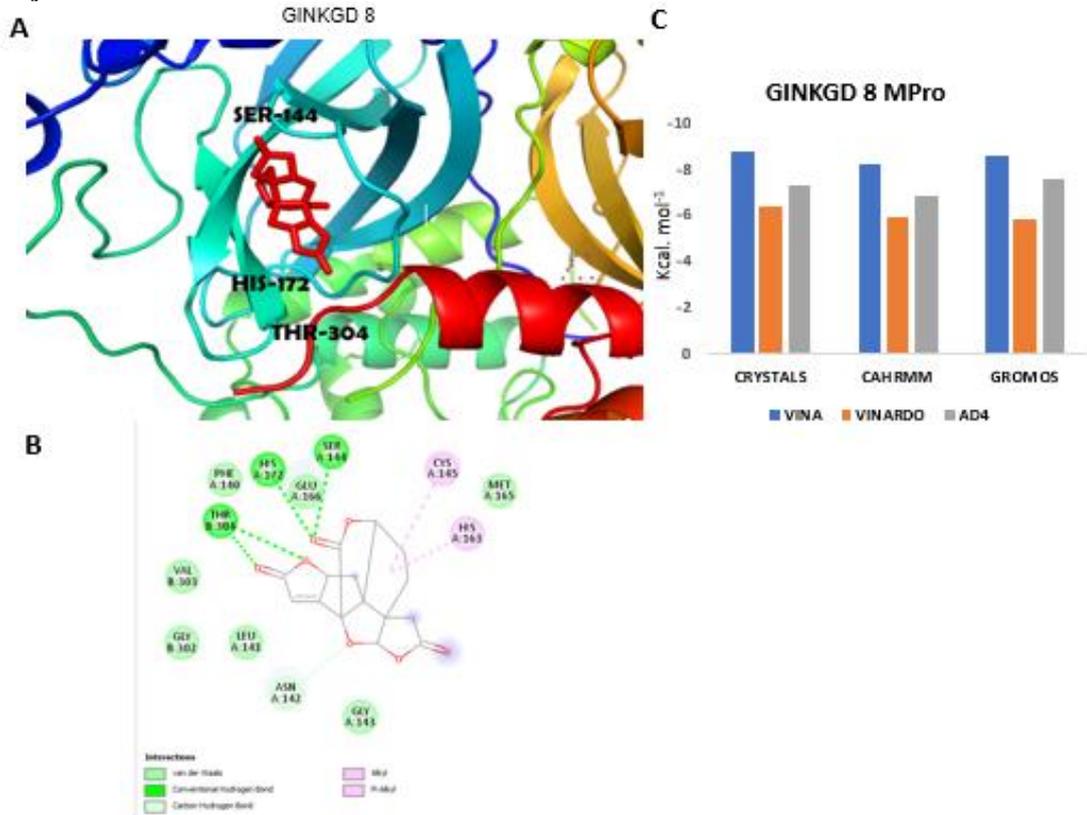
Figura 21 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D7 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 21A, o ligante GINKGD-D7 está no sítio da Mpro. Já a figura 21B mostra interações de hidrogênio com os resíduos cisteína (CYS-145), serina (SER-144) e histidina (HIS-172). Na figura 21C, sua melhor energia foi -8,55 kcal/mol na função de score Vina. Esse ligante já apresentou interação com o resíduo de interesse (CYS-145) que compõe a díade catalítica. Ele apresenta boa energia de interação e faz uma ligação com resíduo da díade catalítica que interage, especificamente, ocupando o sítio da protease e interagindo com canais de íons inibindo- α . Essa referência elétrica e disposição geométrica incita como um bom candidato a inibidor do sítio catalítico, como é explicitado por estudos anteriores que têm por base análises espaciais dessa protease (Xiong et al., 2021).

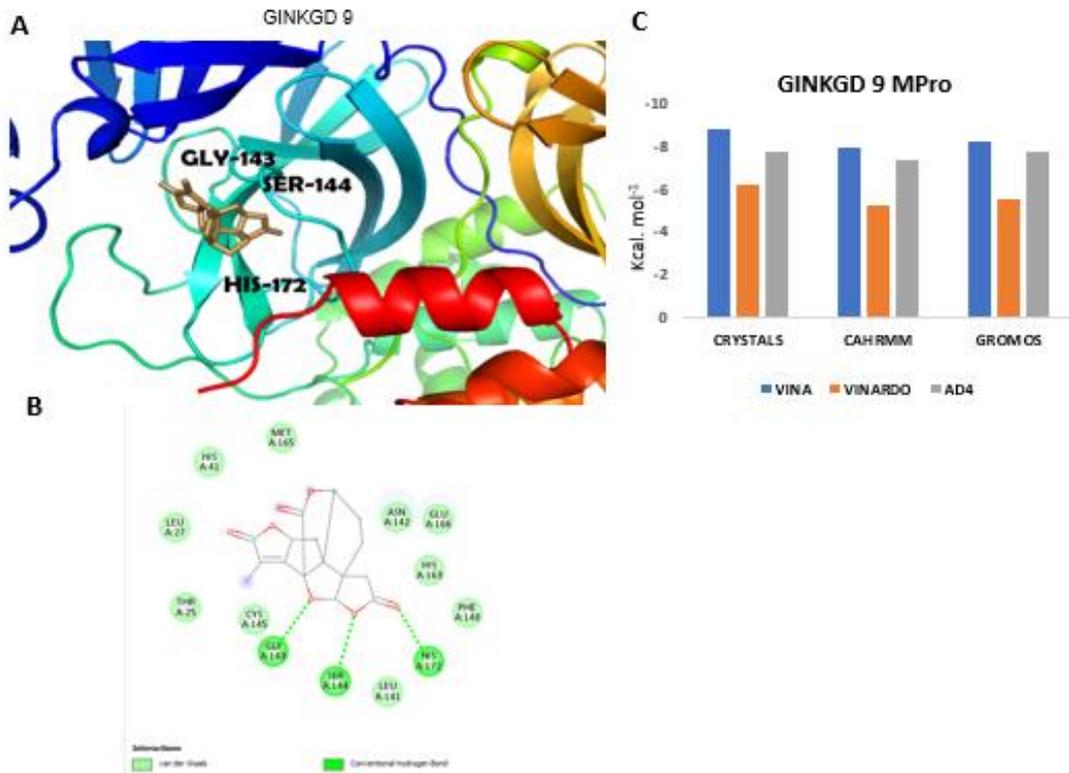
Figura 22 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D8 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 22A, temos o ligante GINKGD-D8 no sítio da Mpro. Já na figura 22B, temos as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), serina (SER-144) e treonina (THR-304). Sua melhor energia é -8,54 kcal/mol na função de score Vina. O ligante que não apresentou pelo menos uma interação com um resíduo que compõe a díade catalítica foi o GINKGD-D8.

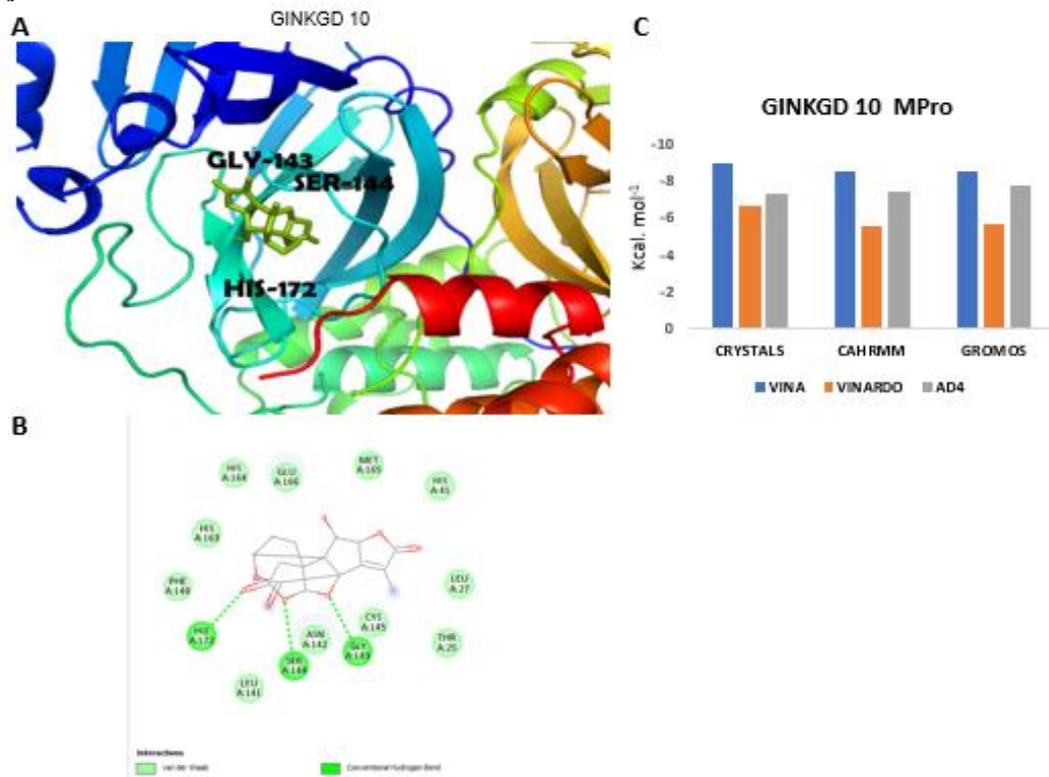
Figura 23 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D9 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação com função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 23A, o ligante GINKGD-D9 está no sítio de ligação da Mpro. Já a figura 23B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme observado no gráfico da figura 23C, a melhor energia de interação foi de -8,36. Esse ligante não apresentou interação com nenhum resíduo que compõe a díade catalítica.

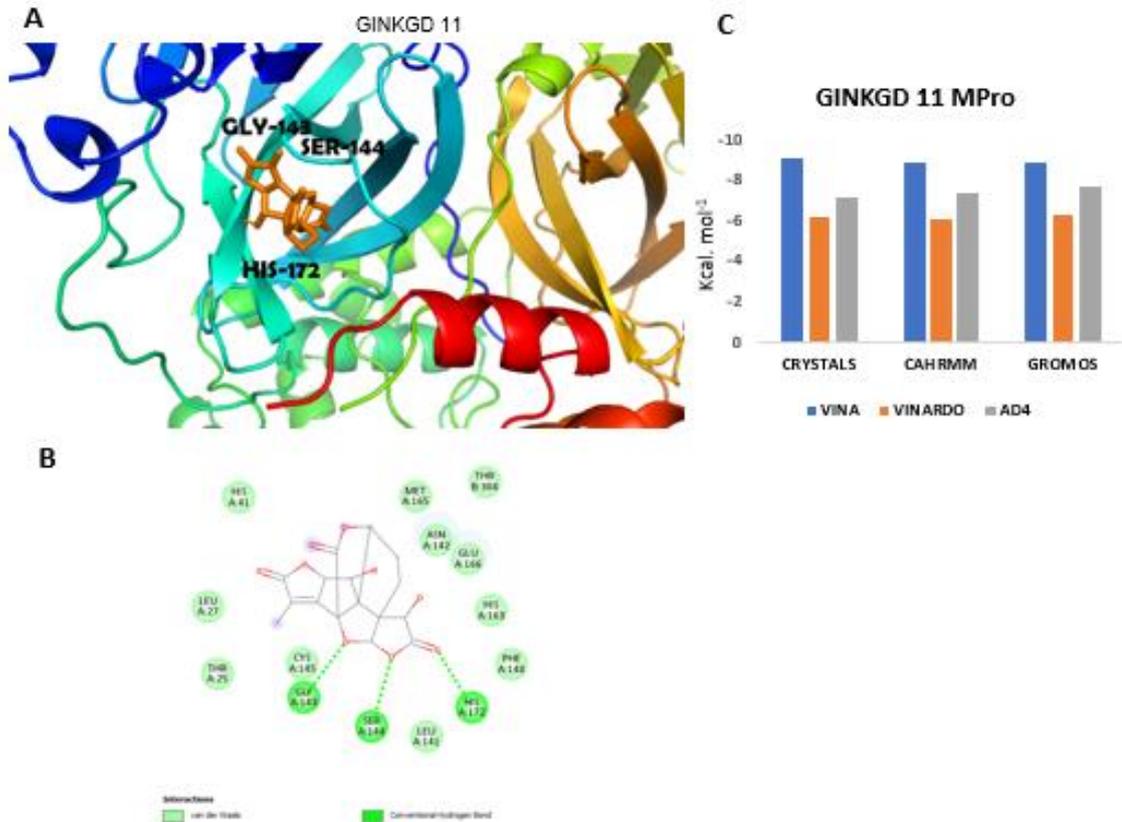
Figura 24 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D10 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 24^a apresenta o ligante GINKGD-D10 no sítio de ligação da Mpro. Já a figura 24B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme observado no gráfico da figura 24C, a melhor energia de interação foi de -8,56. Esse ligante não apresentou interação com nenhum resíduo que compõe a díade catalítica.

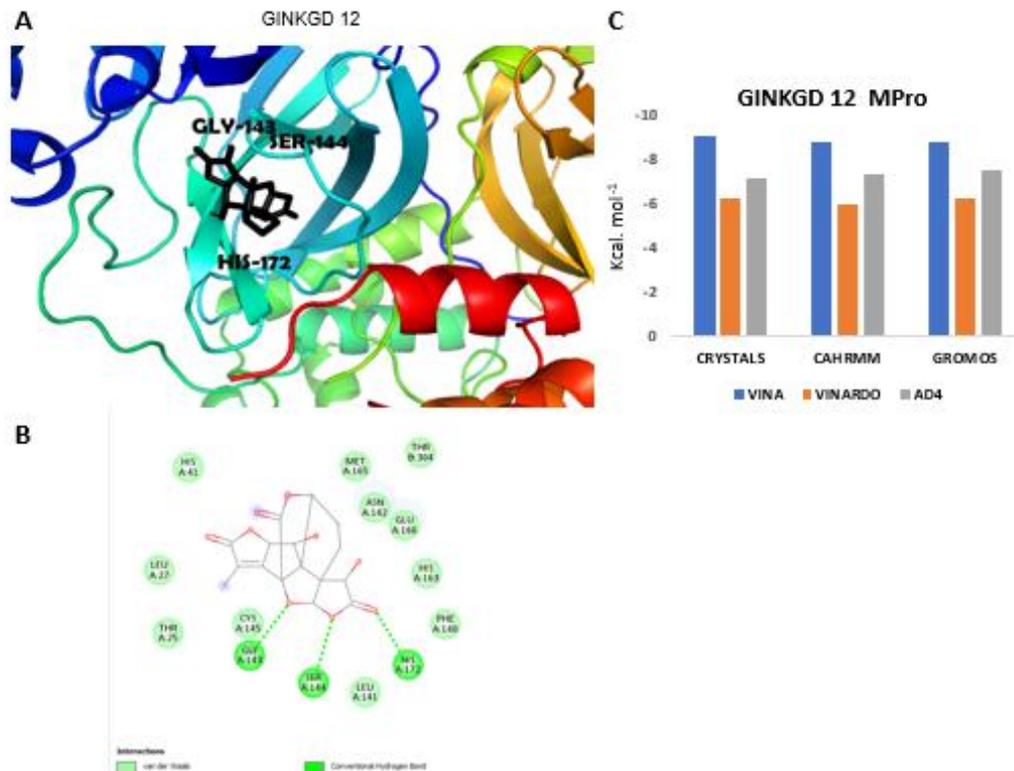
Figura 25 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D11 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 25A apresenta o ligante GINKGD-D11 no sítio de ligação da Mpro. A figura 25B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme observado no gráfico da figura 25C, a melhor energia de interação foi de -8,82. Esse ligante não apresentou interação com nenhum resíduo que compõe a díade catalítica.

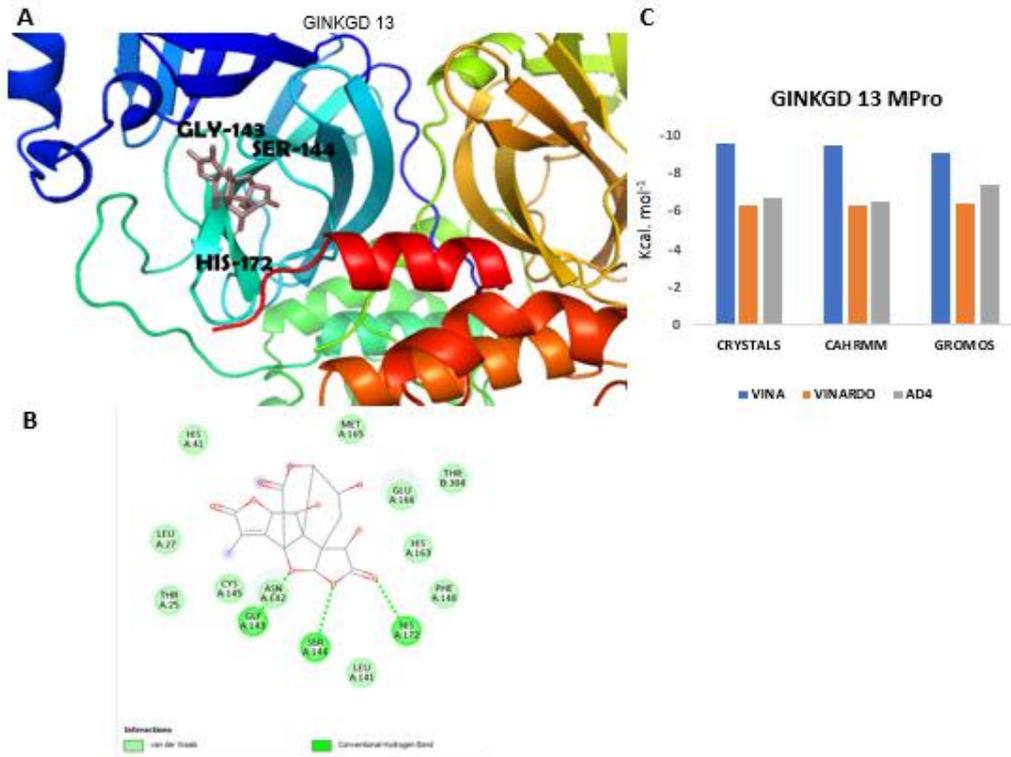
Figura 26 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D12 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação com função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 26A apresenta o ligante GINKGD-D12 no sítio de ligação da Mpro. Já a figura 26B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme observado no gráfico da figura 26C, a melhor energia de interação foi de -8,83. Esse ligante não apresentou interação com nenhum resíduo que compõe a díade catalítica.

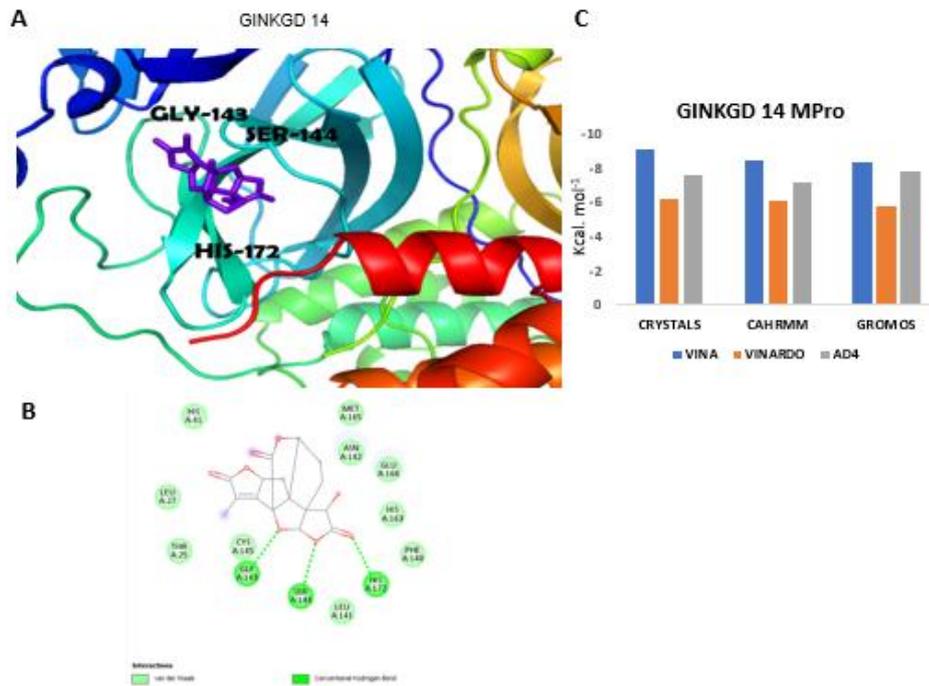
Figura 27 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D13 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 27^a possui o ligante GINKGD-D13 no sítio de ligação da Mpro. Já a figura 27B mostra as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Conforme observado no gráfico 27C, a melhor energia de interação foi de -9,43. Esse ligante não apresentou interação com nenhum resíduo que compõe a díade catalítica.

Figura 28 - Interação molecular dos Ginkgolídeo GINKGD-D14 com resíduos do sítio catalítico da Mpro. (A) representação da melhor geometria do ligante no sítio catalítico da Mpro; (B) principais interações com resíduos do sítio; e (C) distribuição da energia de ligação conforme função de pontuação.



Fonte: elaboração própria.

A figura 28A apresenta o ligante GINKGD-D14 no sítio de ligação da Mpro. Na figura 28B, temos as interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-172), glicina (GLY-143) e serina (SER-144). Sua melhor energia foi -8,52 kcal/mol, respectivamente, na função de score Vina. O ligante apresentado não forneceu nenhuma interação com os principais resíduos que compõem a díade catalítica.

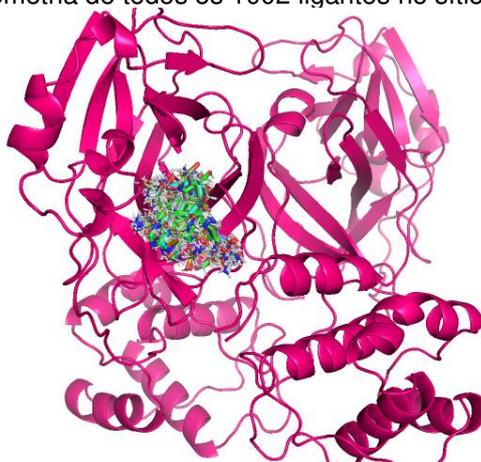
Diante dos dados obtidos, os ligantes da classe dos bilobalídeos que apresentaram pelo menos uma interação de hidrogênio com resíduos de interesse que compõem a díade catalítica foram BLBLD-D1, BLBLD-D4, BLBLD-D5, BLBLD-D6, BLBLD-SKL e BLBLD-PNI. Dentre esses, os ligantes BLBLD-D1 e BLBLD-D2 apresentaram a melhor energia de interação e com o resíduo do sítio catalítico da Mpro (Wang et al., 2021).

Diante dos dados obtidos, os ligantes da classe dos ginkgolídeos que não apresentaram pelo menos uma interação de hidrogênio com resíduos de interesse que compõem a díade catalítica foram: GINKGD-1, GINKGD-2, GINKGD-3, GINKGD-4, GINKGD-5, GINKGD-6, GINKGD-8, GINKGD-9, GINKGD-10, GINKGD-11, GINKGD-12, GINKGD-13 e GINKGD-14. Dentre esses, o ligante GINKGD-7 apresentou interação com o sítio catalítico da Mpro (Al-Kuraishy et al., 2022).

4.2 Derivados estruturais

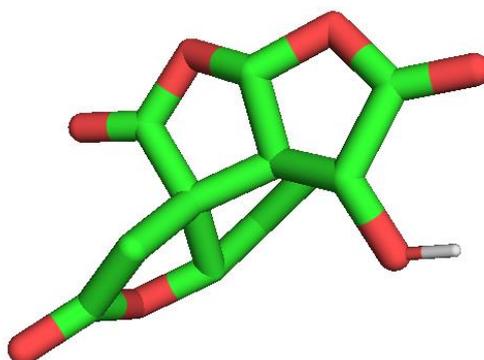
A etapa de derivatização utilizou como estrutura inicial as melhores geometrias (poses) dos representantes bilobalídeos e ginkgnolídeos, conforme obtidas na análise de *ensemble docking* realizada na plataforma DINC-COVID. No grupo dos bilobalídeos, os principais resultados foram obtidos utilizando-se as estruturas BLBLD-D1I e BLBLD-D2II como moléculas base na derivatização. Já para os demais bilobalídeos, obtiveram-se derivados de baixa afinidade de interação (BLBLD-D3, BLBLD-D4 e BLBLD-D 5) ou ainda não foram gerados derivados devido a choques estéricos no sítio alvo (BLBLD-SKL e BLBLD-PNI). Ao todo, foram gerados 1002 derivados do BLBLD-D1, distribuídos por similaridade estrutural em 60 cluster, como pode ser visto no gráfico 1.

Figura 29 - Interação molecular dos derivados do BLBLD D1 com o sítio catalítico da Mpro. Representação da melhor geometria de todos os 1002 ligantes no sítio catalítico da Mpro.



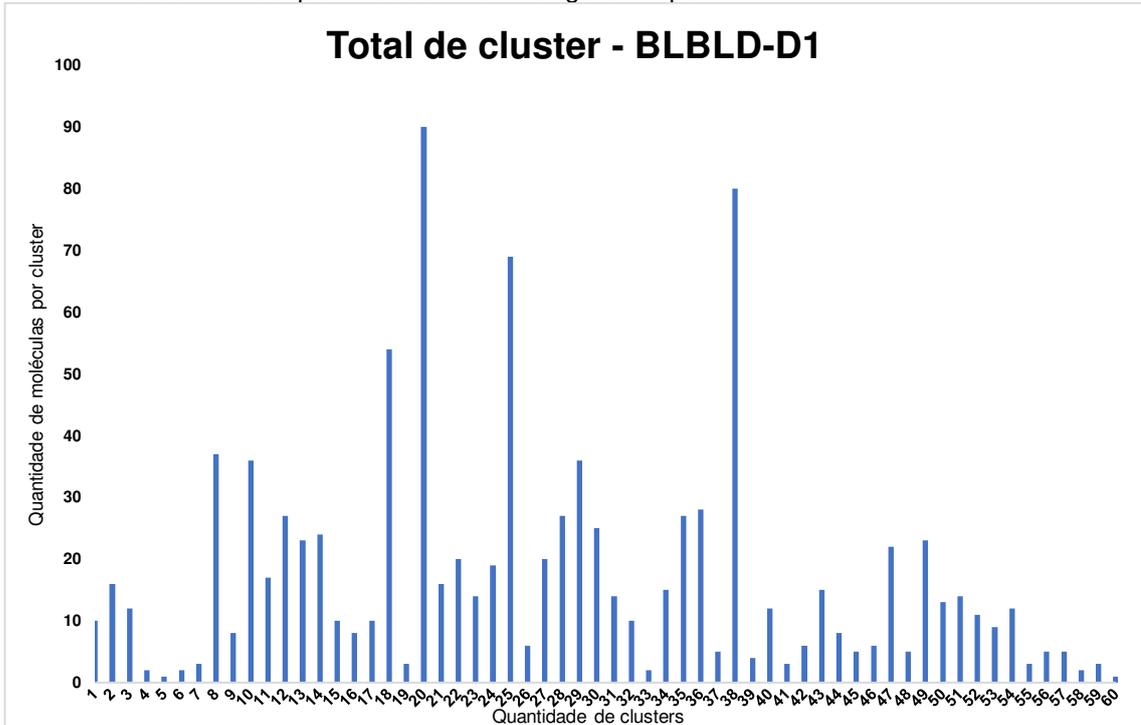
Fonte: elaboração própria.

Figura 30 - Bilobalídeo D1 elencado por melhor resultado de energia e utilizado como molécula inicial para derivatização.



Fonte: elaboração própria.

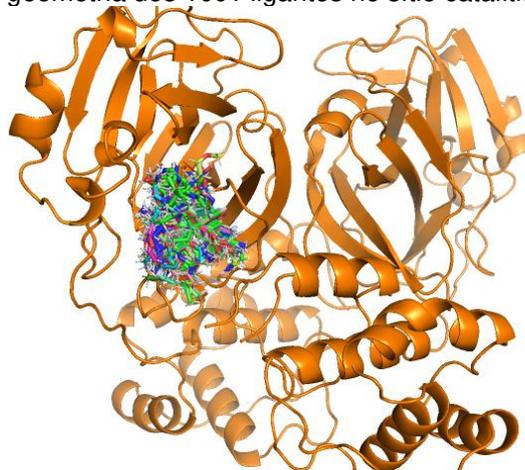
Gráfico 1 - Gráfico com as quantidades de cluster gerados pelo BLBLD D1.



Fonte: elaboração própria.

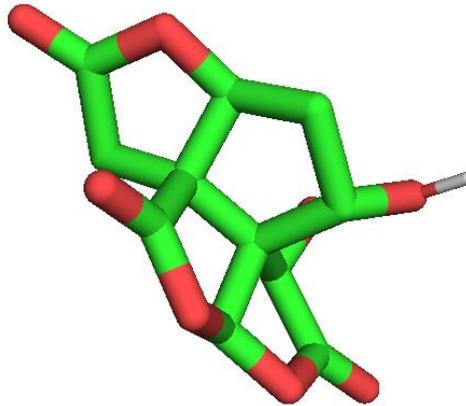
Quando utilizado o bilobalídeo BLBLD-D2II, foram gerados 1001 derivados, agrupados em 76 clusters, como pode ser visto no gráfico 2.

Figura 31 - Interação molecular dos derivados do BLBLD D2 com o sítio catalítico da Mpro. Representação da melhor geometria dos 1001 ligantes no sítio catalítico da Mpro.



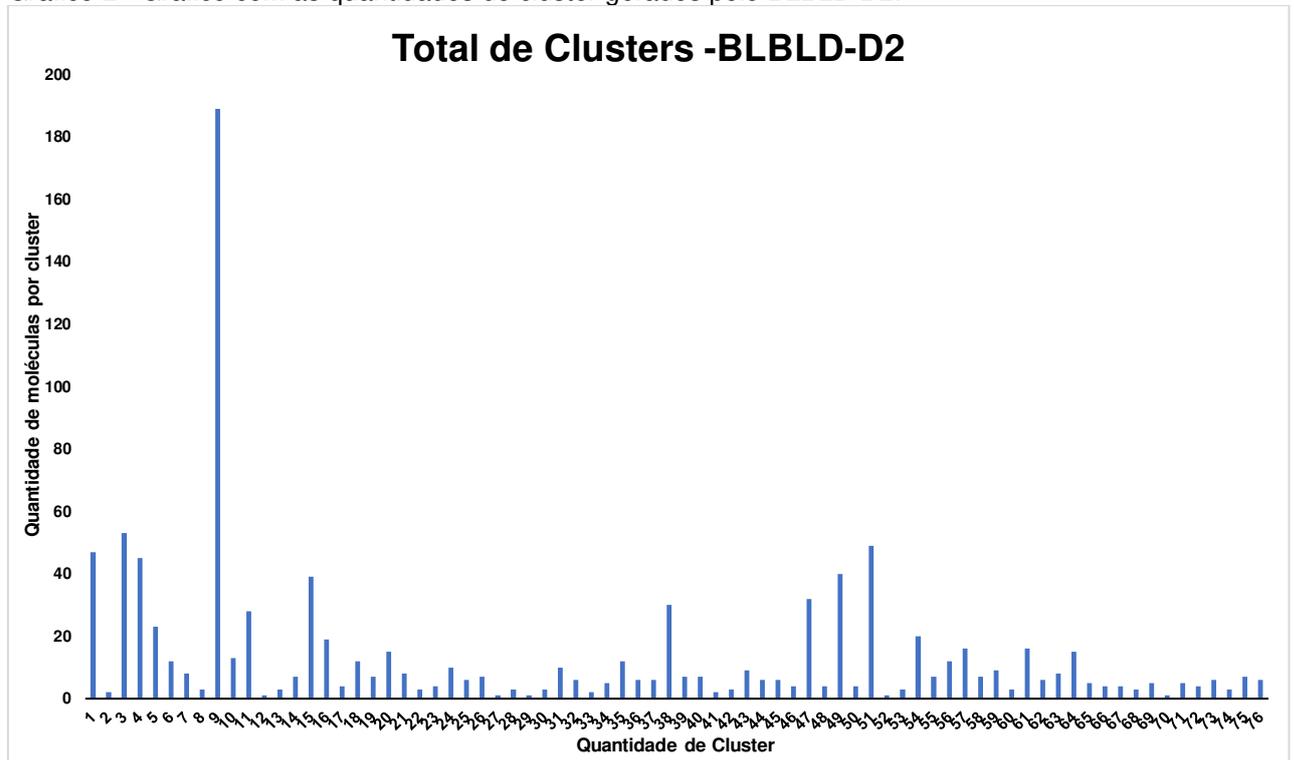
Fonte: elaboração própria.

Figura 32 - Bilobalídeo D2 elencado por melhor resultado de energia e utilizado como molécula inicial para derivatização.



Fonte: elaboração própria.

Gráfico 2 - Gráfico com as quantidades de cluster gerados pelo BLBLD D2.



Fonte: elaboração própria.

4.3 Análise e classificação dos novos derivados estruturais

Nesta etapa, buscou-se reavaliar os derivados estruturais produzidos através do emprego da mesma metodologia (função de pontuação) utilizada durante o *ensemble docking* com o servidor DINC-COVID. Logo, todos os resultados gerados na etapa anterior (derivados produzidos com base na geometria do sítio catalítico) tiveram suas energias de interação com a Mpro reavaliadas no software Vina. Os

resultados para os derivados do BLBLD-D1 estão listados no gráfico 1, enquanto que os resultados para os derivados do BLBD-D2 estão listados no gráfico 2.

Após a reavaliação da energia de interação dos derivados estruturais, os melhores resultados foram selecionados correspondendo à 6 moléculas derivadas do BLBLD D1 e 3 moléculas derivadas do BLBLD D2, conforme representados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Resultados da reavaliação da energia de interação dos derivados do BLBLD-D1, gerados através do software LigBuilder. A função de pontuação utilizada foi Vina, com valores em kcal.mol⁻¹.

Código	Grupo	Derivado BLBLD-D1	Energia (kcal.mol ⁻¹)
C1L1	01	01	-6,82
C4L1	04	01	-6,12
C7L1	07	01	-6,33
C8L20	08	20	-6,03
C22L19	22	19	-6,16
C48L4	48	04	-6,42

Fonte: elaboração própria.

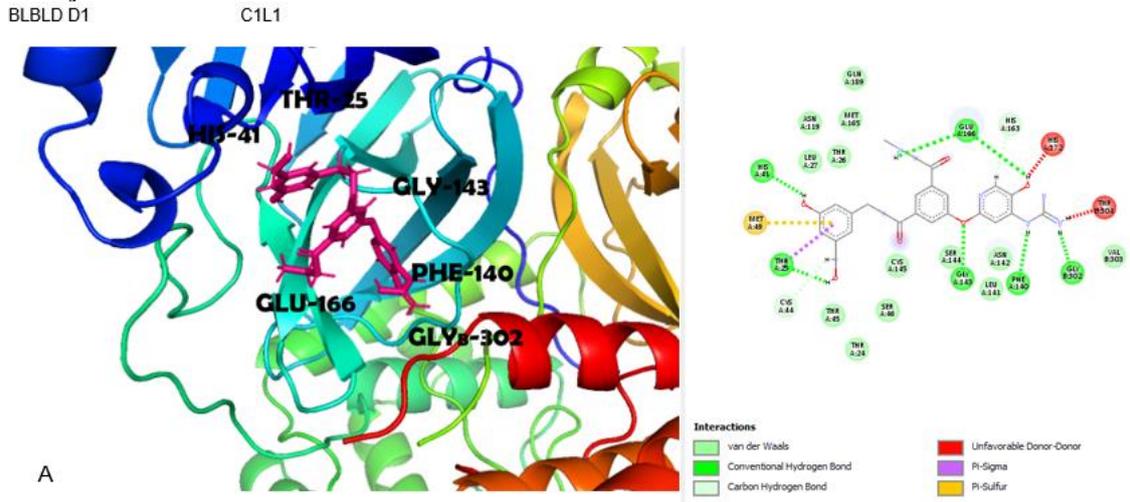
Tabela 5 - Resultados da reavaliação da energia de interação dos derivados do BLBLD-D2, gerados através do software LigBuilder. A função de pontuação utilizada foi Vina, com valores em kcal.mol⁻¹.

Código	Grupo	Derivado BLBLD-D2	Energia (kcal.mol ⁻¹)
C7L1	07	01	-5,59
C62L2	62	02	-5,32
C72L4	72	04	-5,24

Fonte: elaboração própria.

Adicionalmente, foi realizada a inspeção visual dos derivados, seguida da identificação das interações predominantes com os resíduos do sítio. Tais interações correspondem àquelas utilizadas durante o processo de derivatização para guiar a geração de novos compostos.

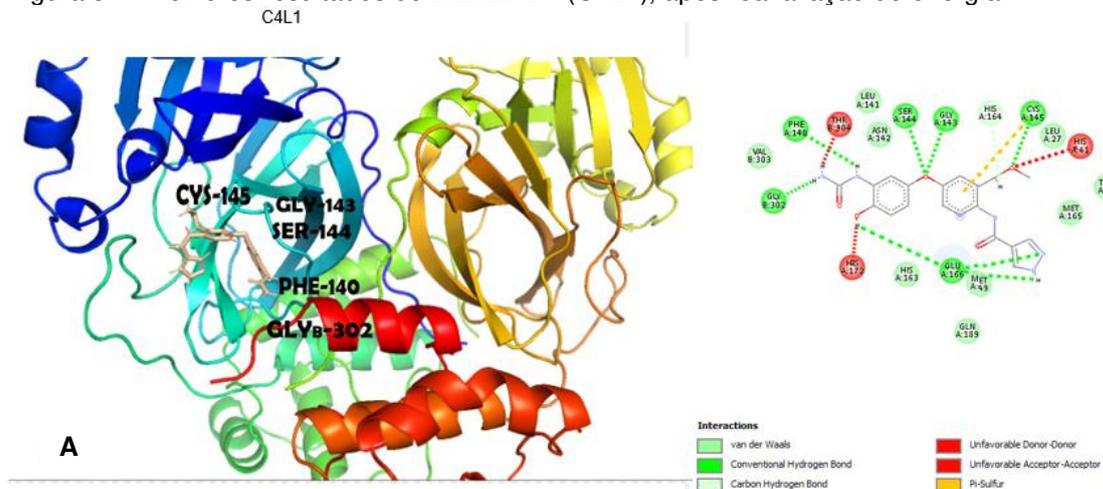
Figura 33 - Representação gráfica (A) da geometria adotada pelo derivado, e (B) da rede de interações com os resíduos do sítio alvo.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 33A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 1 do cluster 1 (C1L1), que, após o processo de derivatização da molécula, aumentou sua distribuição no sítio e suas interações de hidrogênio com os resíduos histidina (HIS-41), treonina (THR-25), glicina (GLY-143), fenilalanina (PHE-140), glutamato (GLU-166) e glicina da cadeia b (GLYB-302). Apresenta 2 ligações infavoráveis de doador. Essa molécula derivada do BLBLD-D1 apresenta significativa ampliação das interações moleculares com o sítio ativo da Mpro, bem como com o resíduo de interesse (HIS-41) (Park et al., 2015).

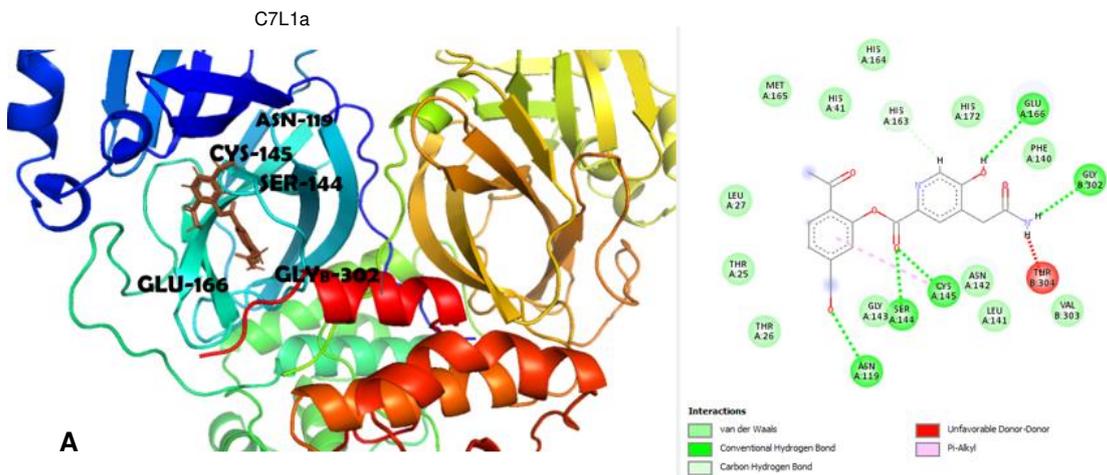
Figura 34 - Melhores resultados do BLBLD-D1 (C4L1), após reavaliação de energia.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 34A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 1 do cluster 4 (C4L1). Nessa imagem, podemos observar interações com resíduos cisteína (CYS-145), fenilalanina (PHE-140), serina (SER-144), glicina (GLY-143), glicina da cadeia b (GLYB-302), bem como aparecem 3 ligações infavoráveis de doador e acceptor. Esse candidato tem presença de ligações desfavoráveis, embora apresente interação com o resíduo de interesse (CYS-145) que faz parte da díade catalítica. Esse dado obtido é importante na resposta imunomediadora da via de replicação viral (Niu, Yuan e Liu, 2022; Shinde et al., 2020).

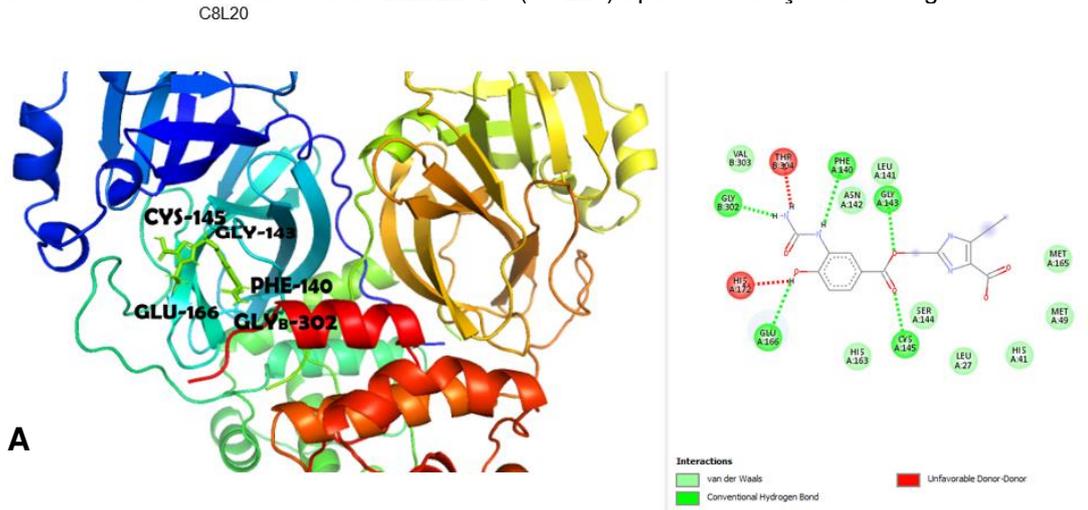
Figura 35 - Melhores resultados do BLBLD-D1 (C7L1a), após reavaliação de energia.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 35A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 1 do cluster 7 (C7L1a). Nela, podemos observar interações com resíduos cisteína (CYS-145), asparagina (ASN-119), serina (SER-144), glutamato (GLU-166) e glicina da cadeia b (GLYB-302). A interação do resíduo de cisteína é importante, pois compõe a díade catalítica e, além da interação de hidrogênio, realiza uma interação hidrofobia Pi-Alkyl e uma interação infavorável de doador. Apresenta interações de interesse com um resíduo de (CYS-145) que compõe a díade catalítica. Essa interação corrobora com a significativa diminuição de danos causados pela resposta celular da infecção viral (Nawrot et al., 2022; Pascoini et al., 2019).

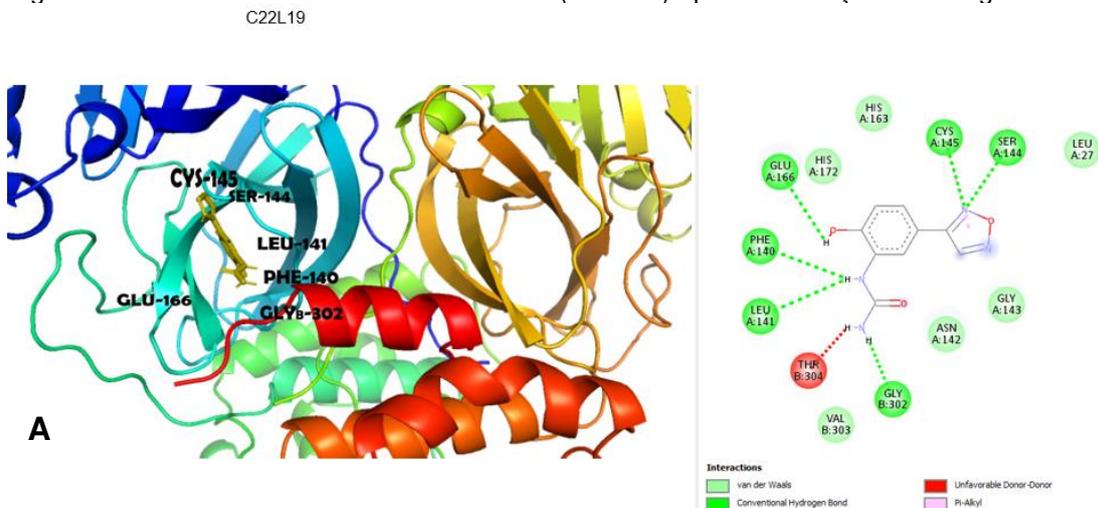
Figura 36 - Melhores resultados do BLBLD-D1 (C8L20) após reavaliação de energia.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 36A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 20 do cluster 8 (C8L20). Podemos observar interações de hidrogênio com resíduos: cisteína (CYS-145), glicina (GLY-143), fenilalanina (PHE-140), glutamato (GLU-166) e glicina da cadeia b (GLYB-302) e duas interações infavoráveis de doador. Esse ligante apresenta importante interação com um dos resíduos que forma a díade catalítica que sinaliza positivamente a inibição dos efeitos danosos das disfunções provocadas pela cascata inflamatória inferida pela infecção (Marinou et al., 2018; Theoharides, 2022).

Figura 37 - Melhores resultados do BLBLD-D1(C22L19) após reavaliação de energia.

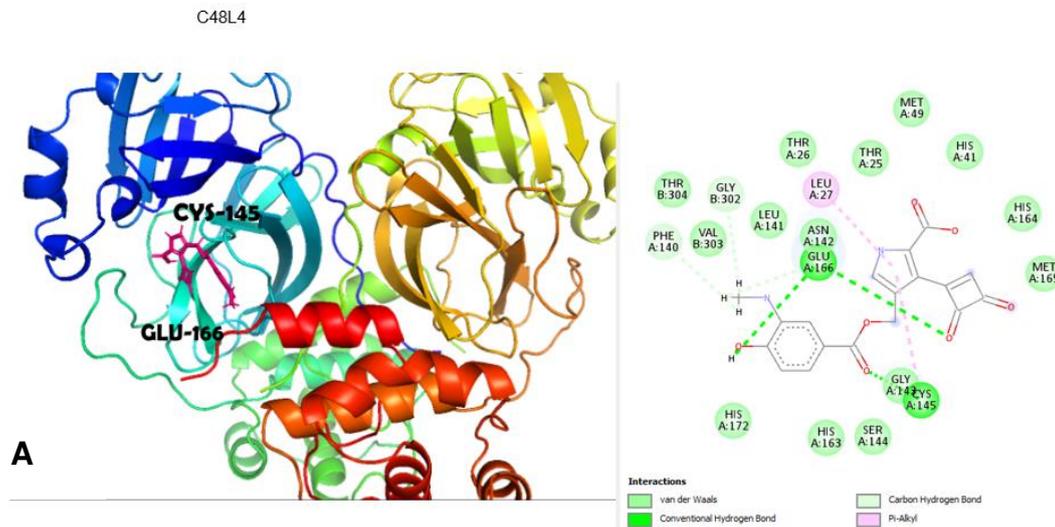


Fonte: elaboração própria.

Na figura 37A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 19 do cluster 20 (C22L19). Nele, podemos observar interações de hidrogênio com resíduos

cisteína (CYS-145), serina (SER-144), glutamato (GLU-166), fenilalanina (PHE-140), leucina (LEU-141) e glicina da cadeia b (GLYB-302) e uma interação infavorável de doador. Esse ligante apresenta boa interação com o resíduo da díade catalítica, o (CYS-145) (Kesharwani et al., 2018; Sanders et al., 2020).

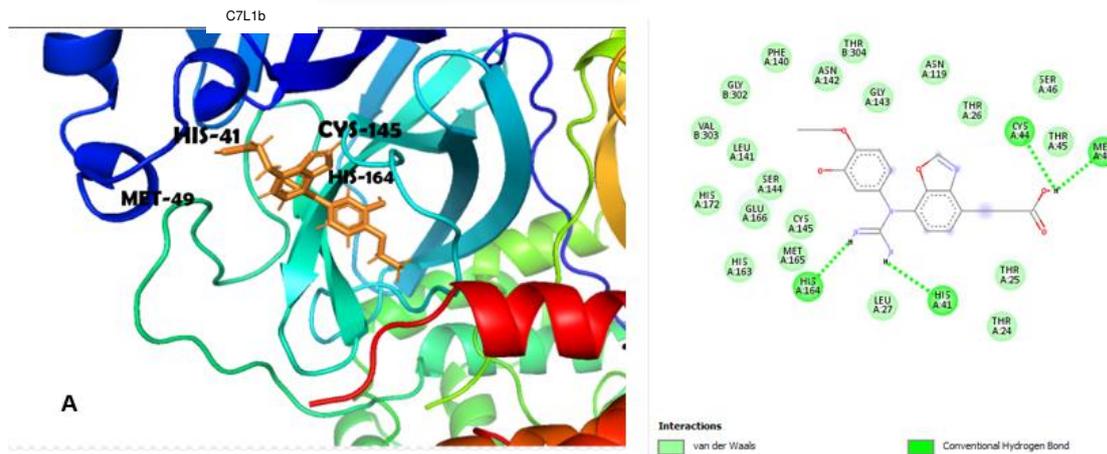
Figura 38 - Melhores resultados do BLBLD-D1 (C48L4) após reavaliação de energia.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 38A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 4 do cluster 48 (C48L4). Nele, podemos observar interações de hidrogênio com resíduos cisteína (CYS-145) e glutamato (GLU-166). Apresenta interação com o resíduo de interesse que forma a díade catalítica, o (CYS-145), ao mesmo tempo que faz uma interação hidrofóbica Pi-Alkyl, podendo esta prejudicar a favorável interação com o resíduo (Gutti et al., 2019; Martínez-Solís et al., 2019).

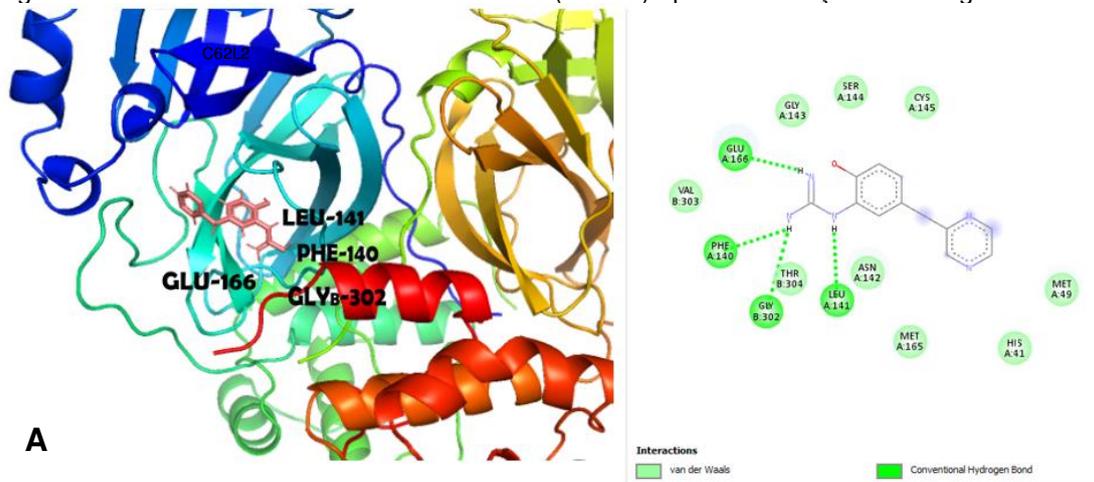
Figura 39 - Melhores resultados do BLBLD-D2 (C7L1b) após reavaliação de energia.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 39A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D2, o ligante 1 do cluster 7 (C7L1b). Podemos observar interações de hidrogênio com resíduos cisteína (CYS-44), histidina (HIS-41), metionina (MET-49) e histidina (HIS-164). Além disso, esse ligante apresenta interação de hidrogênio com (HIS-41, CYS-145) e uma interação com um resíduo da díade catalítica através da (HIS-41). Esse dado infere significativamente no ancoramento perfeito das interações atuando no bloqueio da atividade viral através do sítio proteico (Ibrahim, Ramadan e Mohammed, 2021; Mallia e Shoemake, 2020).

Figura 40 - Melhores resultados do BLBLD-D2 (C62L2) após reavaliação de energia.

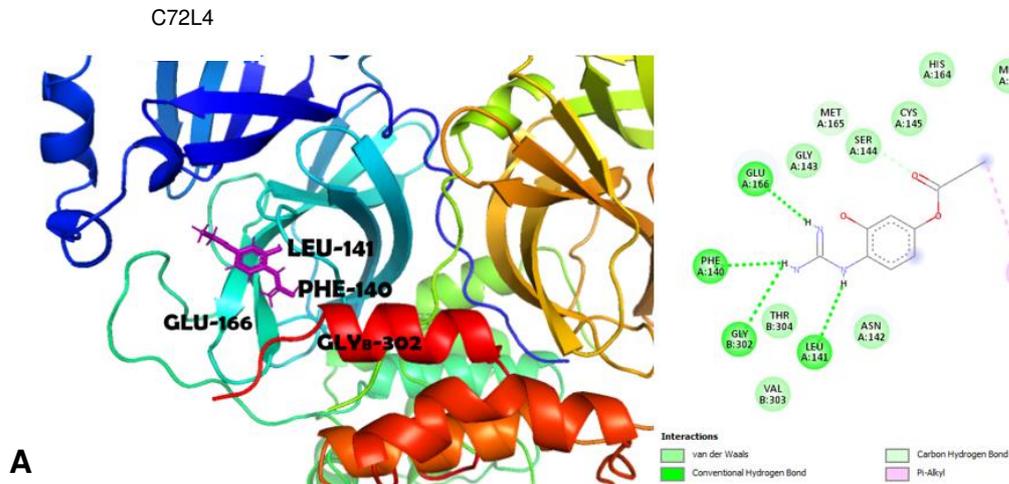


Fonte: elaboração própria.

Na figura 40A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D2, o ligante 2 do cluster 62 (C62L2). Podemos observar interações de hidrogênio com resíduos glutamato (GLU-166), fenilalanina (PHE-140), leucina (LEU-141) e glicina da cadeia b

(GLYB-302). Apresenta possíveis interações de Van der Waals com resíduos que compõem a díade catalítica. No entanto, não se liga a resíduos de interesse para o efetivo bloqueio proteico (Main et al., 2022).

Figura 41 - Melhores resultados do BLBLD-D1(C72L4) após reavaliação de energia.



Fonte: elaboração própria.

Na figura 41A, temos o derivado do bilobalídeo BLBLD-D1, o ligante 4 do cluster 72 (C72L4). Podemos observar interações de hidrogênio com resíduos leucina (LEU-141), fenilalanina (PHE-140), glutamato (GLU-166) e glicina da cadeia b (GLYB-302) (Dhar et al., 2012).

De forma geral, após o processo de derivatização dos ligantes bilobalídeos, pode-se observar a melhor distribuição das interações de hidrogênios dentro do sítio de ligação da Mpro, diferenciando do obtido após a etapa inicial de atracamento (Mallia e Shoemake, 2020; Shinde et al., 2020). Os ginkgolídeos, não apresentaram candidatos hábeis ao processo de derivatização.

4.4 ADME

Nossas análises de reavaliação de interação dos derivados estruturais do Bilobalídeo D1 indicaram seis candidatos como promissores. Dessa forma, eles foram submetidos à análise de propriedades farmacocinéticas. Os resultados dessa análise estão listados na tabela 6.

Tabela 6 - Os derivados selecionados do Bilobalídeo D1 (BLBLD-D1).

Parâmetros	Composto C1L1	Composto C4L1	Composto C7L1a	Composto C8L20	Composto C22L19	Composto C48L4
------------	---------------	---------------	----------------	----------------	-----------------	----------------

Peso molecular	494,52	397,38	344,32	348,31	220,18	370,31
Átomos pesados	36	29	25	25	16	27
Átomos p.aromáticos	18	17	12	11	11	11
Ligações rotáveis	12	9	7	8	3	7
Aceptores de ligações H.	8	6	7	7	5	7
Doadores de ligações H	7	5	3	5	3	4
Refratividade molar	134,79	86,66	60,37	85,71	54,36	92,84
Log Po/w	1,86	2,26	0,58	0,88	0,74	1,01
Log S (ESOL)	-2,91	-2,45	-1,77	-2,04	-1,3	-2,5
Absorção GI	Baixa	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Lipinski, Violação	2	0	0	0	0	0
Acessibilidade Sintética	3,82	2,97	2,84	2,87	2,27	3,31

Legenda: *C-indica qual cluster o ligante representa, **L- indica qual molécula representa.
 Fonte: elaboração própria.

Conforme observado na tabela 6, somente o ligante 1 do cluster 1 (C1L1) com energia -6,82 kcal/mol, apresenta duas violações de Lipinski e ligações rotáveis acima de 10 e ligações doadoras de hidrogênio acima de 5 (Costa, 2021). Tanto o candidato do cluster 7 ligante 1 (C7L1a) com energia -6,33 kcal/mol, quanto o candidato do cluster 22 ligante 19 (22L19) com energia -6,16 kcal/mol, apresentaram alta absorção gastrointestinal. Através dessas caracterizações farmacocinéticas como a biodisponibilidade, lipofilicidade e as demais sugerem boa permeabilidade por membranas biológicas. Essas informações fornecidas pelos parâmetros são utilizadas para guiar o prosseguimento do estudo, classificando os possíveis candidatos à inibição (Rodrigues et al., 2021).

Tabela 7 - Os derivados selecionados do Bilobalídeo D2 (BLBLD-D2).

Parâmetros	Composto C7L1b	Composto C62L2	Composto C72L4
Peso molecular	384,39	243,26	223,23
Átomos pesados	28	18	16
Átomos p.aromáticos	15	12	6
Ligações rotáveis	8	4	4
Aceptores de ligações H.	7	4	4
Doadores de ligações H	4	4	4
Refratividade molar	104,43	69,11	60,37

Log Po/w	2,98	0,89	0,82
Log S (ESOL)	-3,31	-1,63	-1,47
Absorção GI	Baixa	Baixa	Alta
Lipinski, Violação	0	0	0
Acessibilidade Sintética	3,46	2,38	4,31

Legenda: *C-indica qual cluster o ligante representa, **L- indica qual molécula representa.

Fonte: elaboração própria.

Dentre os derivados advindos do BLBLD D2, nenhum apresentou violação de Lipinski. O candidato do cluster 7 ligante 1 (C7L1b) com energia -5,59 não violou os parâmetros dispostos, bem como o candidato do cluster 62 ligante 2 com energia -5,32 não apresentou violações dos parâmetros listados acima, mas apresentaram baixa absorção gastrointestinal. O candidato do cluster 72 ligante 1 (C72L1) apresenta energia -5,24 kcal/mol com alta absorção gastrointestinal e não viola nenhum dos outros parâmetros farmacocinéticos apresentados (Domínguez-Villa e Angeles, 2020).

Portanto, as análises de interações apontam que o grupo dos derivados do BLBLD D1 apresentam pelo menos uma ligação infavorável e as análises farmacocinéticas de absorção, distribuição, excreção e metabolismo apresentou pelo menos um candidato com 2 violações de Lipinski. Dessa forma, pelos parâmetros estudados, as nossas análises indicam que os compostos mais promissores para futuras análises e desenvolvimento de inibidores são C7L1b, C62L2 e C72L4.

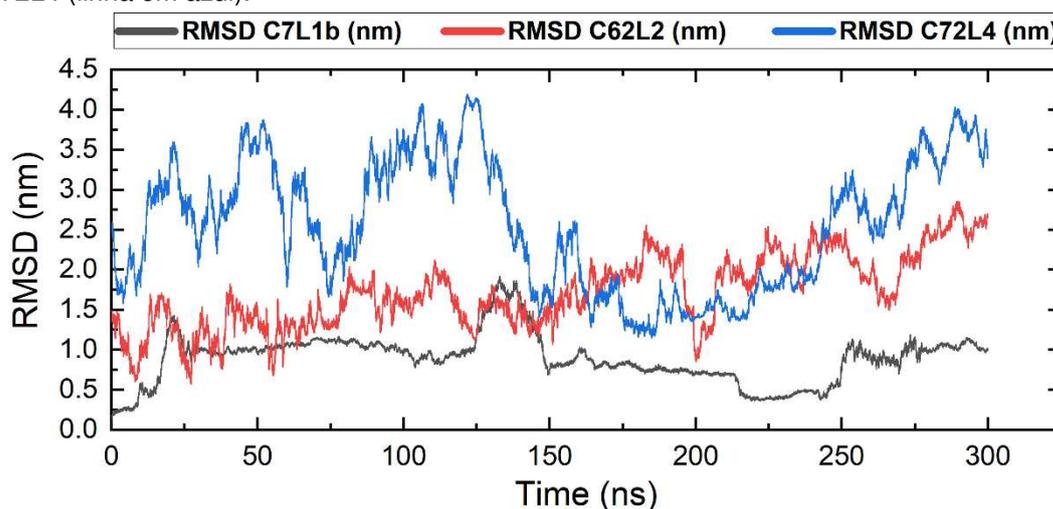
4.5 Dinâmica molecular (DM)

Depois da análise de parâmetros como energia de afinidade e dados de farmacocinética, alguns ligantes foram selecionados e seguiram para a etapa de dinâmica molecular. Dentre a série de compostos gerados, sobressaíram-se os C7L1b, C62L2 e C72L4 dentre os derivados dos bilobalídeos. Embora sejam derivados da mesma molécula, suas diferenças estruturais influenciam fortemente nas interações com a proteína. Interações intermoleculares, como ligações de hidrogênios, formadas por essas moléculas podem alterar a conformação do ligante e auxiliar sua ancoragem ao sítio ativo da proteína, por exemplo (Luo et al., 2020).

Para o presente trabalho, foi realizado uma dinâmica molecular de 300ns com as moléculas C7L1b, C62L2 e C72L4. Os valores obtidos de RMSD mostraram

que o complexo formado pela Mpro e o C7L1b foi o melhor dentre os compostos testados, apresentando maior estabilidade se comparado aos outros ligantes estudados (Figura 42). Os complexos C62L2 e C72L4 indicaram uma variação estrutural significativa, demonstrando que a formação do complexo entre a proteína e o ligante não estabilizou no decorrer da DM. O gráfico com os valores de RMSD é mostrado na Figura 42.

Figura 42 - Valores de RMSD para as moléculas C7L1b (linha cinza), C62L2 (linha em vermelho) e C72L4 (linha em azul).



Fonte: elaboração própria.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, realizamos um estudo de atracamento molecular de moléculas de origem do *Ginkgo Biloba*, os bilobalídeos e os ginkgolídeos como possíveis inibidores do sítio catalítico da protease principal do SARS-CoV-2.

Os resultados do atracamento mostraram algumas interações com o resíduo Cys-145, da díade catalítica. Para melhor explorar o espaço químico possível nesse alvo, foi realizado uma etapa de derivatização molecular, que gerou 2003 novas moléculas.

Os novos derivados estruturais foram submetidos à reavaliação da energia de interação com a Mpro. Desses, os melhores candidatos foram avaliados quanto as suas propriedades farmacocinéticas e a sua estabilidade de ligação na Mpro.

Nossos resultados indicam que, dentre os derivados do BLBDL-D2, um novo composto (C7L1b) apresentou características importantes para um candidato à inibidor da Mpro, tais como: interações com os resíduos do sítio catalítico e estabilidade de ligação. Embora modestos, vale ressaltar que esse alvo é extremamente difícil de ser inibido, vide os esforços empregados pela comunidade científica nos últimos três anos.

Logo, acredita-se que os resultados aqui encontrados servirão como guia em estudos futuros, visando o desenho racional de novos agentes terapêuticos inspirados em produtos naturais.

Infelizmente, desenvolver um inibidor eficiente do sítio catalítico da Mpro do SRS-CoV-2 tem-se provado uma tarefa ardua para toda a comunidade científica. As análises realizadas neste trabalho nos permitiram avançar muito no entendimento do mecanismo de interação de derivados do Ginko Biloba nesse alvo, contudo, algumas análises ainda necessitarão ser realizadas para melhor elucidarmos as interações nesses complexos.

Dentre essas análises estão: realizar a decomposição energética dos compostos selecionados e que falharam nas simulações de dinâmica molecular, de forma a identificar pontos fracos (interações individuais entre resíduos específicos e os ligantes) que possam ser alvos de nova derivatização para gerar compostos mais estáveis; expandir a simulação de dinâmica molecular do composto C7L1 e realizar a análise de energia livre de ligação, juntamente com a decomposição de interação individual por ligante; gerar novos derivados estruturais do composto C7L1 e repetir

as análises de forma a identificar novas moléculas com boas propriedades (ou uma classe derivada).

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. *et al.* Rational design of potent anti-COVID-19 main protease drugs: An extensive multi-spectrum in silico approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 330, p. 115636, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33612899/>. Acesso em: 13 mai. 2022.
- AL-KURAI SHY, H. M. *et al.* Ginkgo biloba in the management of the COVID-19 severity. **Archiv der Pharmazie**, v. 355, n. 10, p. 2200188, 7 out. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35672257/>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- ANDRADE, K. R. C. de *et al.* **Pharmacological therapies for patients with human coronavirus infections: A rapid systematic review.** [s.l.: s.n.]. v. 25. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32876256/>. Acesso em: 18 set. 2020.
- AZEVEDO, T. C. P. de *et al.* Use of remdesivir for patients with Covid-19: A review article. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, n. 6, p. 838–841, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/dmVpW8W4GBKn3bPYPCBhCBL/>. Acesso em: 12 out. 2020.
- BEIGEL, J. H. *et al.* Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 19, p. 1813–1826, 2020. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2007764>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- BERENDSEN, H. J. C. **Hierarchical Modeling from Quantum Mechanics to Fluid Dynamics.** [s.l.] Cambridge University Press, 2007. Disponível em: https://primo.njit.edu/permalink/01NJIT_INST/1I2s57n/alma991393593405196. Acesso em: 16 jun. 2021.
- BEZERRA, J. A.; BRITO, M. M. DE. Potencial nutricional e antioxidantes das Plantas alimentícias não convencionais (PANCs) e o uso na alimentação: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343872464_Potencial_nutricional_e_antioxidantes_das_Plantas_alimenticias_nao_convencionais_PANCs_e_o_uso_na_alimentacao_Revisao. Acesso em: 15 jan. 2021.
- BHARDWAJ, V. K.; PUROHIT, R. Computer simulation to identify selective inhibitor for human phosphodiesterase10A. **Journal of Molecular Liquids**, v. 328, p. 115419, 2021. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/348702840_Computer_simulation_to_identify_selective_inhibitor_for_human_phosphodiesterase10A. Acesso em: 10 mai. 2022.
- BHOWMICK, S. *et al.* Identification of potential cruzain inhibitors using de novo design, molecular docking and dynamics simulations studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 13, p. 4005–4015, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/335656129_Identification_of_Potential_Cruzain_Inhibitors_Using_De_Novo_Design_Molecular_Docking_and_Dynamics_Simulations_Studies. Acesso em: 20 mai. 2021.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários De Plantas. **Revista Agrotecnologia, Ipameri**, n. 11, p. 54–67, 2020. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/9705>. Acesso em: 15 dez. 2020.

BRAZ, H. L. B. *et al.* Estudo in silico de fitoquímicos na região Receptor-Binding Domain (RBD) da proteína spike do SARS-CoV-2 (variante Ômicron, B.1.1.529). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e404111033126, 2022. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstreams/a0d8d8ff-a12a-40cb-b805-e9219efa221e/download>. Acesso em: 20 jan, 2023.

CARMO FILHO, A. DO; FAKOURY, M. K.; FERRY, F. R. DE A. Ginkgo biloba e memória - revisão sistemática. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 13, n. 1, p. 145–152, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbagg/a/JKThtGdD84L3g7N9TDFycJn/>. Acesso em: 20 mai. 2020.

CHAZAL, N.; GERLIER, D. Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 2, p. 226–237, 2003. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC156468/>. Acesso em: 05 jun. 2020.

COSTA, E. D. Previsão in silico ADME / T de novos inibidores potenciais contra o vírus da dengue. **Research, Society and Development**, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/14459/12967/189079>. Acesso em: 19 mai. 2022.

DESERNO, M.; HOLM, C. How to mesh up Ewald sums. I. a theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines. **Journal of Chemical Physics**, v. 109, n. 18, p. 7678–7693, 1998. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/cond-mat/9807099>. Acesso em: 10 mai. 2020.

DIAS, V. M. DE C. H. *et al.* Orientações sobre Diagnóstico, Tratamento e Isolamento de Pacientes com COVID-19. **Journal of Infection Control**, v. 9, n. 2, p. 56–75, 2020. Disponível em: <https://infectologia.org.br/wp-content/uploads/2020/07/orientacoes-sobre-diagnostico-tratamento-e-isolamento-de-pacientes-com-covid-19.pdf>. Acesso em: 25 mai. 2020.

DITTMAR, M. *et al.* Drug repurposing screens reveal cell-type-specific entry pathways and FDA-approved drugs active against SARS-Cov-2. **Cell Reports**, v. 35, n. 1, p. 108959, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33811811/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

DONG, Y. *et al.* A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00352-y>. Acesso em: 12 nov. 2020.

FALCON, W. E. *et al.* Ensemble Docking in Drug Discovery: How Many Protein Configurations from Molecular Dynamics Simulations are Needed to Reproduce Known Ligand Binding? **Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 25, p. 5189–

5195, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30695645/>. Acesso em: 10 mai. 2020.

FERNANDES, L. A. L. **Desenho, Síntese e Avaliação Biológica de Inibidores de Proteases de Cisteína**. Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 2011. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10451/11596>. Acesso em: 24 mai. 2020.

FORLENZA, O. V. Ginkgo biloba e memória: mito ou realidade? **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 30, n. 6, p. 218–220, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpc/a/6YfLPGpznwFFHDhLwTtG9tN/>. Acesso em: 10 jul. 2020.

FREITAS, A. R.; GIOVANETTI, M.; ALCANTARA, L. C. J. Variantes emergentes do SARS-CoV-2 e suas implicações na saúde coletiva. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 4, 2021. Disponível em: <https://iajmh.com/iajmh/article/download/181/206/952>. Acesso em: 12 dez. 2021.

FUJITANI, H. *et al.* Direct calculation of the binding free energies of FKBP ligands. **Journal of Chemical Physics**, v. 123, n. 8, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16164283/>. Acesso em: 11 mai. 2020.

GAO, X. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 1, p. 237–245, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32895623/>. Acesso em: 27 mar. 2022.

GIL, C. *et al.* COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12359–12386, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32511912/>. Acesso em: 25 nov. 2021.

GORDON, D. E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, v. 583, n. 7816, p. 459–468, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2286-9>. Acesso em: 03 jul. 2020.

GREASLEY, S. E. *et al.* Structural basis for the in vitro efficacy of nirmatrelvir against SARS-CoV-2 variants. **The Journal of biological chemistry**, v. 298, n. 6, p. 101972, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35461811/>. Acesso em: 05 ago. 2022.

GROSS, L. Z. F. *et al.* ACE2, the Receptor that Enables Infection by SARS-CoV-2: Biochemistry, Structure, Allostery and Evaluation of the Potential Development of ACE2 Modulators. **ChemMedChem**, v. 15, n. 18, p. 1682–1690, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32663362/>. Acesso em: 16 out. 2020.

GUTTI, G. *et al.* Development of pyrazole and spiropyrazoline analogs as multifunctional agents for treatment of Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry**, v. 90, n. April, p. 103080, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31271946/>. Acesso em: 07 ago. 2020.

HALL-SWAN, S. *et al.* DINC-COVID: A webserver for ensemble docking with flexible SARS-CoV-2 proteins. **Computers in Biology and Medicine**, v. 139, n. July, p.

104943, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8518241/>. Acesso em: 17 out. 2022.

HANSEN, N. *et al.* A Suite of Advanced Tutorials for the GROMOS Biomolecular Simulation Software [Article v1.0]. **Living Journal of Computational Molecular Science**, v. 2, n. 1, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://livecomsjournal.org/index.php/livecoms/article/view/v2i1e18552>. Acesso em: 06 jan. 2021.

HARVEY, W. T. *et al.* SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409–424, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00573-0>. Acesso em: 10 fev. 2021.

HESS, B. *et al.* LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/2790343_LINCS_A_Linear_Constraint_Solver_for_molecular_simulations. Acesso em: 29 ago. 2020.

HESS, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116–122, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ct700200b>. Acesso em: 14 jul. 2020.

HOSPITAL, A. *et al.* Molecular dynamics simulations: Advances and applications. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 37–47, 2015. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4655909/>. Acesso em: 28 jun. 2020.

IBRAHIM, M. A.; RAMADAN, H. H.; MOHAMMED, R. N. Evidence that Ginkgo Biloba could use in the influenza and coronavirus COVID-19 infections. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 131–143, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33594843/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

IKSEN, I. *et al.* Identifying molecular targets of Aspiletrein-derived steroidal saponins in lung cancer using network pharmacology and molecular docking-based assessments. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-28821-8>. Acesso em: 19 fev. 2023.

IMRAN, M. *et al.* Discovery, Development, and Patent Trends on Molnupiravir: A Prospective Oral Treatment for COVID-19. **Molecules**, v. 26, p. 5795, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8510125/>. Acesso em: 25 out. 2021.

JIANG, Y. *et al.* Cytokine storm in COVID-19: from viral infection to immune responses, diagnosis and therapy. **International Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 459–472, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8741849/>. Acesso em: 27 mai. 2022.

JIN, Z. *et al.* Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, 2020. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41586-020-2223-y>. Acesso em: 05 jul. 2020.

JU, B. *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. **Nature**, v. 584, n. 7819, p. 115–119, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2380-z>. Acesso em: 18 set. 2021.

KAUSHIK, A. K. *et al.* Electrochemical SARS-CoV-2 Sensing at Point-of-Care and Artificial Intelligence for Intelligent COVID-19 Management. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 11, p. 7306–7325, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.0c01004>. Acesso em: 20 nov. 2020.

KAWAKAMI, S. *et al.* Ginkgo biloba Extract Containing Plasmalogen May Improve Long COVID and Brain Fog: A Case Report. **Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences**, v. 3, n. 10, p. 1271–1275, 2022. Disponível em: <https://www.jelsciences.com/articles/jbres1589.pdf&reportURL=https://safeweb.norton.com/report/show?url=https://www.jelsciences.com/articles/jbres1589.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2023.

KESHARWANI, R. K. *et al.* Computational study of curcumin analogues by targeting DNA topoisomerase II: a structure-based drug designing approach. **Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 0, 2018. Disponível em: <https://ouci.dntb.gov.ua/en/works/7WebAgZl/>. Acesso em: 16 mai. 2020.

KHATEEB, J.; LI, Y.; ZHANG, H. Emerging SARS-CoV-2 variants of concern and potential intervention approaches. **Critical Care**, v. 25, n. 1, p. 1–8, 2021. Disponível em: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-021-03662-x>. Acesso em: 14 mar. 2022.

KIM, D. *et al.* The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 914–921.e10, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32330414/>. Acesso em: 23 jan. 2021.

KLEMM, T. *et al.* Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2. **The EMBO Journal**, v. 39, n. 18, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32845033/>. Acesso em: 04 abr. 2021.

KNELLER, D. W. *et al.* Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL Mpro active site cavity revealed by room temperature X-ray crystallography. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 7–12, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-16954-7>. Acesso em: 11 abr. 2021.

KO, M. *et al.* Comparative analysis of antiviral efficacy of FDA-approved drugs against SARS-CoV-2 in human lung cells. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 3, p. 1403–1408, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32767684/>. Acesso em: 18 jun. 2021.

KOUZNETSOVA, V. L. *et al.* Potential COVID-19 papain-like protease PLpro inhibitors: Repurposing FDA-approved drugs. **PeerJ**, v. 8, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://peerj.com/articles/9965/>. Acesso em: 20 out. 2020.

LALMUANAWMA, S. *et al.* Applications of machine learning and artificial intelligence for Covid-19 (SARS-CoV-2) pandemic: a review. **International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology**, v. 4, n. January, p. 160–164, 2020. Disponível em: <https://ijarsct.co.in/past.html>. Acesso em: 17 mai. 2021.

LI, D.; LUAN, J.; ZHANG, L. Molecular docking of potential SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2021, 72 a 79. Disponível em: rstoragev2.blob.core.windows.net/e70a6377eeaf177acef29aaa93c63b1a/PMC7698687.pdf. Acesso em: 15 jul. 2021.

LIANG, H. *et al.* Virtual screening FDA approved drugs against multiple targets of SARS-CoV-2. **Clinical and Translational Science**, v. 14, n. 3, p. 1123–1132, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8014887/>. Acesso em: 14 mai. 2022.

LIMA, L. N. G. C.; DE SOUSA, M. S.; LIMA, K. V. B. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2020. Disponível em: <https://periodicos.unichristus.edu.br/jhbs/article/view/3232>. Acesso em: 05 mai. 2021.

LIU, L. *et al.* Advances in the chemical constituents and chemical analysis of Ginkgo biloba leaf, extract, and phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 193, n. 866, p. 113704, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33157480/>. Acesso em: 01 set. 2022.

MALLIA, E.; SHOEMAKE, D. C. Design of Novel Protein Kinase Inhibitors Using the Naturally Occurring Staurosporine Scaffold as a Lead. **American Journal of PharmTech Research**, v. 10, n. 03, p. 184–191, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343784037_Design_of_Novel_Protein_Kinase_Inhibitors_Using_the_Naturally_Occurring_Staurosporine_Scaffold_as_a_Lead. Acesso em: 11 jul. 2020.

MARINOU, M. *et al.* Structure-based design and application of a nucleotide coenzyme mimetic ligand: Application to the affinity purification of nucleotide dependent enzymes. **Journal of Chromatography A**, v. 1535, p. 88–100, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29331223/>. Acesso em: 25 jun. 2020.

MARTÍNEZ-SOLÍS, I. *et al.* Neuroprotective Potential of Ginkgo biloba in Retinal Diseases. **Planta Medica**, v. 85, n. 17, p. 1292–1303, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31266069/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

MARZI, M. *et al.* Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and in Silico Study. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9283023/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

MENACHERY, V. D.; GRAHAM, R. L.; BARIC, R. S. Jumping species—a

mechanism for coronavirus persistence and survival. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5474123/>. Acesso em: 29 mai. 2020.

MORTAZAVI, P.; HOSSEINZADEH, M. H.; EBRAHIMZADEH, M. A. Effects of Methanolic Extract of Ginkgo biloba Leaf against Hypoxia-Induced Lethality in Mice. **Tabari Biomedical Student Research Journal**, n. 4, 2021. Disponível em: <https://tbsrj.mazums.ac.ir/article-1-3736-en.html>. Acesso em: 02 abr. 2021.

MOURÃO, E. D. S. *et al.* Identification of molecular scaffolds from Caatinga Brazilian biome with potential against Aedes aegypti by molecular docking and molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Structure**, v. 1229, n. xxxx, 2021. Disponível em: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2021JMoSt122929621M/abstract>. Acesso em: 18 out. 2021.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecletica Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eq/a/FKXQP7hsfpP3Sgzw4GL7Vkg/?lang=pt>. Acesso em: 12 mai. 2020.

NAWROT, J. *et al.* Medicinal Herbs in the Relief of Neurological, Cardiovascular, and Respiratory Symptoms after COVID-19 Infection a Literature Review. **Cells**, v. 11, n. 12, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35741026/>. Acesso em: 19 ago. 2022.

NIU, T. T.; YUAN, B. Y.; LIU, G. Z. Ginkgolides and bilobalide for treatment of Alzheimer's disease and COVID-19: potential mechanisms of action. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 24, p. 9502–9510, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36591860/>. Acesso em: 15 jan. 2023.

NOVOA, R. R. *et al.* Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 2, p. 147–172, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15656780/>. Acesso em: 20 mai. 2020.

OU, X. *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32221306/>. Acesso em: 28 jan. 2021.

PAIVA-OLIVEIRA, E. L. *et al.* Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 1, p. 96, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/download/6245/4459>. Acesso em: 12 jul. 2020.

PARK, H. *et al.* Computational design and discovery of nanomolar inhibitors of I κ B kinase β . **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 1, p. 337–348, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25513719/>. Acesso em: 03

jun. 2020.

PARK, S. J. *et al.* Antiviral efficacies of FDA-approved drugs against SARS-COV-2 infection in ferrets. **mBio**, v. 11, n. 3, 2020. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mbio.01114-20>. Acesso em: 07 dez. 2020.

PASCOINI, A. L. *et al.* In silico development of new acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 37, n. 4, p. 1007–1021, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29607738/>. Acesso em: 20 jan. 2021.

RODRIGUES, G. S. *et al.* The use of free softwares in practical class about the molecular filters of oral bioavailability of drugs. **Quimica Nova**, v. 44, n. 8, p. 1036–1044, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/yvPwPhYP6cDdxVd4wD4hJ9r/>. Acesso em: 12 jan. 2022.

ROUCHKA, E. C.; CHARIKER, J. H.; CHUNG, D. Variant analysis of 1,040 SARS-CoV-2 genomes. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11 November, p. 495–504, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0241535>. Acesso em: 04 dez. 2020.

RUDRAPAL, M. *et al.* Repurposing of phytomedicine-derived bioactive compounds with promising anti-SARS-CoV-2 potential: Molecular docking, MD simulation and drug-likeness/ADMET studies. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 2432–2446, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X21010494>. Acesso em: 10 out. 2022.

SANDERS, J. M. *et al.* Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 18, p. 1824–1836, 2020. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2764727>. Acesso em: 20 mai. 2021.

SANTOS, G. R. R. M. Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. p. 76, 2007. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/USP_ce87def85d8551061728e69418e30565. Acesso em: 19 mai. 2020.

SCHENEIDER, C. M. *et al.* O extrato de folhas e sementes do ginkgo, *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) no tratamento e profilaxia das isquemias. **Natureza on line**, v. 5, p. 90–95, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/dskFSddMdfP73Vx46hGY5cM/?lang=pt>. Acesso em: 15 jul. 2020.

SHAGHAGHI, N. Molecular Docking study of novel COVID-19 Protease with low risk Terpenoides Compounds of Plants. **ChemRxiv**, v. 1, n. 1, 2020. Disponível em: <https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/article-details/60c74898f96a001f292870ad>. Acesso em: 05 mai. 2020.

SHINDE, P. B. *et al.* De novo design based identification of potential HIV-1 integrase

inhibitors: A pharmacoinformatics study. **Computational Biology and Chemistry**, v. 88, n. May, p. 107319, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32801062/>. Acesso em: 10 nov. 2020.

SHINA, S.; TAM, B.; WANG, S. M. Applications of Molecular Dynamics Simulation in Protein Study. **Membranes**, v. 12, n. 9, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36135863/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

STEIN, R. M. *et al.* Property-Unmatched Decoys in Docking Benchmarks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 2, p. 699–714, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7913603/>. Acesso em: 20 mar. 2022.

SYED, Y. Y. Molnupiravir: First Approval. **Drugs**, v. 82, n. 4, p. 455–460, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35184266/>. Acesso em: 10 ago. 2022.

THEOHARIDES, T. C. Could SARS-CoV-2 Spike Protein Be Responsible for Long-COVID Syndrome? **Molecular Neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 1850–1861, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35028901/>. Acesso em: 10 mar. 2023.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16211538/>. Acesso em: 10 set. 2020.

VLACHAKIS, D. *et al.* Introducing Drugster: A comprehensive and fully integrated drug design, lead and structure optimization toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 126–128, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23104887/>. Acesso em: 10 de mai. 2020.

WEINSTEIN, M.; SKINNER, J. Sounding Board Biomedical Research and Health Advances. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 5, p. 567–571, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21306245/>. Acesso em: 29 set. 2021.

ZHANG, L. *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**, v. 368, n. 6489, p. 409–412, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32198291/>. Acesso em: 12 mai. 2021.

ZHANG, Q. *et al.* Quality and fragility of meta-analyses assessing the efficacy and safety of Ginkgo biloba preparation: protocol for a methodological study. **Annals of Palliative Medicine**, v. 11, n. 10, p. 3315–3319, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36226650/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

ZHANG, X. W.; YAP, Y. L.; ALTMAYER, R. M. Generation of predictive pharmacophore model for SARS-coronavirus main proteinase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 57–62, 2005. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7115589/>. Acesso em: 18 mai. 2021.

**ANEXO A - TABELA COM TODOS OS VALORES DE ENERGIA DE INTERAÇÃO
DOS DERIVADOS DA MOLÉCULA BLBLD D1**

Tabela com os valores de rescoring dos derivados da molécula BLBLD D1 (energias < -5 kcal/mol)															
Receptor	Grupo	Ligante	Energia kcal/mol	Receptor	Grupo	Ligante	Energia kcal/mol	Receptor	Grupo	Ligante	Energia kcal/mol	Receptor	Grupo	Ligante	Energia kcal/mol
3CLpro	1	8	-7.71	3CLpro	20	38	-5.59	3CLpro	14	22	-5.42	3CLpro	20	23	-5.22
3CLpro	1	7	-7.71	3CLpro	20	37	-5.59	3CLpro	14	4	-5.42	3CLpro	20	24	-5.22
3CLpro	1	9	-7.22	3CLpro	20	34	-5.59	3CLpro	14	3	-5.42	3CLpro	38	20	-5.21
3CLpro	1	10	-7.22	3CLpro	20	35	-5.59	3CLpro	14	1	-5.42	3CLpro	38	21	-5.21
3CLpro	1	1	-6.82	3CLpro	20	39	-5.59	3CLpro	14	6	-5.42	3CLpro	38	22	-5.21
3CLpro	1	2	-6.60	3CLpro	26	2	-5.59	3CLpro	14	2	-5.42	3CLpro	38	23	-5.21
3CLpro	1	3	-6.60	3CLpro	24	16	-5.59	3CLpro	14	5	-5.42	3CLpro	38	19	-5.21
3CLpro	1	4	-6.60	3CLpro	24	15	-5.59	3CLpro	14	17	-5.41	3CLpro	43	7	-5.21
3CLpro	1	5	-6.60	3CLpro	24	14	-5.59	3CLpro	14	16	-5.41	3CLpro	43	6	-5.21
3CLpro	1	6	-6.45	3CLpro	24	17	-5.59	3CLpro	14	19	-5.41	3CLpro	43	8	-5.21
3CLpro	48	4	-6.42	3CLpro	24	18	-5.59	3CLpro	14	14	-5.41	3CLpro	43	9	-5.21
3CLpro	48	5	-6.42	3CLpro	24	11	-5.59	3CLpro	14	18	-5.41	3CLpro	43	10	-5.21
3CLpro	48	1	-6.42	3CLpro	24	12	-5.59	3CLpro	32	7	-5.41	3CLpro	33	1	-5.19
3CLpro	48	3	-6.42	3CLpro	24	13	-5.59	3CLpro	32	8	-5.41	3CLpro	33	2	-5.19
3CLpro	48	2	-6.42	3CLpro	24	19	-5.59	3CLpro	32	10	-5.41	3CLpro	15	4	-5.16
3CLpro	7	1	-6.33	3CLpro	3	10	-5.58	3CLpro	32	6	-5.41	3CLpro	35	11	-5.16
3CLpro	7	2	-6.33	3CLpro	3	11	-5.58	3CLpro	32	9	-5.41	3CLpro	35	14	-5.16
3CLpro	7	3	-6.33	3CLpro	3	8	-5.58	3CLpro	8	33	-5.39	3CLpro	20	20	-5.16
3CLpro	22	19	-6.16	3CLpro	3	9	-5.58	3CLpro	8	31	-5.39	3CLpro	20	17	-5.16
3CLpro	22	20	-6.16	3CLpro	3	7	-5.58	3CLpro	8	30	-5.39	3CLpro	20	18	-5.16
3CLpro	22	17	-6.16	3CLpro	3	12	-5.58	3CLpro	8	32	-5.39	3CLpro	20	19	-5.16
3CLpro	22	16	-6.16	3CLpro	8	15	-5.58	3CLpro	8	34	-5.39	3CLpro	20	16	-5.16
3CLpro	22	18	-6.16	3CLpro	8	19	-5.58	3CLpro	38	52	-5.37	3CLpro	20	21	-5.16
3CLpro	4	1	-6.11	3CLpro	8	14	-5.58	3CLpro	38	48	-5.37	3CLpro	20	22	-5.16
3CLpro	8	20	-6.03	3CLpro	8	18	-5.58	3CLpro	38	51	-5.37	3CLpro	20	67	-5.16
3CLpro	8	21	-6.03	3CLpro	8	13	-5.58	3CLpro	38	50	-5.37	3CLpro	20	64	-5.16
3CLpro	8	22	-6.03	3CLpro	8	17	-5.58	3CLpro	38	46	-5.37	3CLpro	20	65	-5.16
3CLpro	8	24	-6.03	3CLpro	8	16	-5.58	3CLpro	38	42	-5.37	3CLpro	20	66	-5.16
3CLpro	8	23	-6.03	3CLpro	51	11	-5.58	3CLpro	18	11	-5.36	3CLpro	20	68	-5.16
3CLpro	8	27	-6.01	3CLpro	51	12	-5.58	3CLpro	18	15	-5.36	3CLpro	20	69	-5.16
3CLpro	8	25	-6.01	3CLpro	51	13	-5.58	3CLpro	18	16	-5.36	3CLpro	20	70	-5.16
3CLpro	8	28	-6.01	3CLpro	51	14	-5.58	3CLpro	18	14	-5.36	3CLpro	11	9	-5.16
3CLpro	8	26	-6.01	3CLpro	22	6	-5.57	3CLpro	18	10	-5.36	3CLpro	27	16	-5.15
3CLpro	8	29	-6.01	3CLpro	22	7	-5.57	3CLpro	18	17	-5.36	3CLpro	27	15	-5.15
3CLpro	8	8	-6.01	3CLpro	22	10	-5.57	3CLpro	18	13	-5.36	3CLpro	27	14	-5.15
3CLpro	8	12	-6.01	3CLpro	22	9	-5.57	3CLpro	18	12	-5.36	3CLpro	27	13	-5.15
3CLpro	8	9	-6.01	3CLpro	22	8	-5.57	3CLpro	18	18	-5.36	3CLpro	41	3	-5.14
3CLpro	8	10	-6.01	3CLpro	20	11	-5.56	3CLpro	18	19	-5.36	3CLpro	41	1	-5.14
3CLpro	8	11	-6.01	3CLpro	20	12	-5.56	3CLpro	38	26	-5.35	3CLpro	41	2	-5.14
3CLpro	22	15	-5.95	3CLpro	20	8	-5.56	3CLpro	38	31	-5.35	3CLpro	2	14	-5.13
3CLpro	22	11	-5.95	3CLpro	20	15	-5.56	3CLpro	38	24	-5.35	3CLpro	2	16	-5.13
3CLpro	22	13	-5.95	3CLpro	20	13	-5.56	3CLpro	38	29	-5.35	3CLpro	2	15	-5.13
3CLpro	22	12	-5.95	3CLpro	20	10	-5.56	3CLpro	38	28	-5.35	3CLpro	2	13	-5.13

3CLpro	22	14	-5.95	3CLpro	20	9	-5.56	3CLpro	27	17	-5.35	3CLpro	11	13	-5.12
3CLpro	20	88	-5.91	3CLpro	20	14	-5.56	3CLpro	27	19	-5.35	3CLpro	11	11	-5.12
3CLpro	20	87	-5.91	3CLpro	11	15	-5.56	3CLpro	27	20	-5.35	3CLpro	11	10	-5.12
3CLpro	20	83	-5.91	3CLpro	11	16	-5.56	3CLpro	27	18	-5.35	3CLpro	11	12	-5.12
3CLpro	20	84	-5.91	3CLpro	11	17	-5.56	3CLpro	11	4	-5.32	3CLpro	27	1	-5.11
3CLpro	20	85	-5.91	3CLpro	11	14	-5.56	3CLpro	11	2	-5.32	3CLpro	27	3	-5.11
3CLpro	20	86	-5.91	3CLpro	38	7	-5.55	3CLpro	11	3	-5.32	3CLpro	27	2	-5.11
3CLpro	14	15	-5.88	3CLpro	38	9	-5.55	3CLpro	11	1	-5.32	3CLpro	27	4	-5.11
3CLpro	14	13	-5.88	3CLpro	38	12	-5.55	3CLpro	38	32	-5.32	3CLpro	18	21	-5.11
3CLpro	14	12	-5.88	3CLpro	38	8	-5.55	3CLpro	38	27	-5.32	3CLpro	18	20	-5.11
3CLpro	8	6	-5.86	3CLpro	38	14	-5.55	3CLpro	38	25	-5.32	3CLpro	18	22	-5.11
3CLpro	8	4	-5.86	3CLpro	38	18	-5.55	3CLpro	38	30	-5.32	3CLpro	18	25	-5.11
3CLpro	8	1	-5.86	3CLpro	38	16	-5.55	3CLpro	17	9	-5.32	3CLpro	18	24	-5.11
3CLpro	8	5	-5.86	3CLpro	4	2	-5.54	3CLpro	17	3	-5.32	3CLpro	18	26	-5.11
3CLpro	8	7	-5.86	3CLpro	23	6	-5.54	3CLpro	17	6	-5.32	3CLpro	18	23	-5.11
3CLpro	8	2	-5.86	3CLpro	23	5	-5.54	3CLpro	17	7	-5.32	3CLpro	21	16	-5.10
3CLpro	8	3	-5.86	3CLpro	23	2	-5.54	3CLpro	17	4	-5.32	3CLpro	38	77	-5.09
3CLpro	28	25	-5.79	3CLpro	23	1	-5.54	3CLpro	17	2	-5.32	3CLpro	38	69	-5.09
3CLpro	28	24	-5.79	3CLpro	23	4	-5.54	3CLpro	17	8	-5.32	3CLpro	38	73	-5.09
3CLpro	28	23	-5.79	3CLpro	23	3	-5.54	3CLpro	17	5	-5.32	3CLpro	38	75	-5.09
3CLpro	28	22	-5.79	3CLpro	32	3	-5.53	3CLpro	21	15	-5.31	3CLpro	38	68	-5.09
3CLpro	28	27	-5.78	3CLpro	32	2	-5.53	3CLpro	18	38	-5.31	3CLpro	38	71	-5.09
3CLpro	28	26	-5.78	3CLpro	32	1	-5.53	3CLpro	18	34	-5.31	3CLpro	38	76	-5.09
3CLpro	28	21	-5.76	3CLpro	32	5	-5.53	3CLpro	18	40	-5.31	3CLpro	18	54	-5.09
3CLpro	28	17	-5.75	3CLpro	32	4	-5.53	3CLpro	18	36	-5.31	3CLpro	38	67	-5.09
3CLpro	28	18	-5.75	3CLpro	21	5	-5.52	3CLpro	18	39	-5.31	3CLpro	38	65	-5.09
3CLpro	28	20	-5.75	3CLpro	21	7	-5.52	3CLpro	18	37	-5.31	3CLpro	38	66	-5.09
3CLpro	28	19	-5.75	3CLpro	21	6	-5.52	3CLpro	18	35	-5.31	3CLpro	15	6	-5.08
3CLpro	20	63	-5.73	3CLpro	14	9	-5.52	3CLpro	60	1	-5.30	3CLpro	15	5	-5.08
3CLpro	20	60	-5.73	3CLpro	14	8	-5.52	3CLpro	26	6	-5.29	3CLpro	15	7	-5.08
3CLpro	20	61	-5.73	3CLpro	14	7	-5.52	3CLpro	26	3	-5.29	3CLpro	18	33	-5.06
3CLpro	20	62	-5.73	3CLpro	14	10	-5.52	3CLpro	26	4	-5.29	3CLpro	18	30	-5.06
3CLpro	20	59	-5.73	3CLpro	14	11	-5.52	3CLpro	26	5	-5.29	3CLpro	18	28	-5.06
3CLpro	21	11	-5.73	3CLpro	13	12	-5.48	3CLpro	38	5	-5.29	3CLpro	18	31	-5.06
3CLpro	21	10	-5.73	3CLpro	13	2	-5.48	3CLpro	38	6	-5.29	3CLpro	18	32	-5.06
3CLpro	22	5	-5.73	3CLpro	13	11	-5.48	3CLpro	38	2	-5.29	3CLpro	18	29	-5.06
3CLpro	22	2	-5.73	3CLpro	13	7	-5.48	3CLpro	38	4	-5.29	3CLpro	18	27	-5.06
3CLpro	22	4	-5.73	3CLpro	13	1	-5.48	3CLpro	38	3	-5.29	3CLpro	9	7	-5.06
3CLpro	22	3	-5.73	3CLpro	13	8	-5.48	3CLpro	10	25	-5.28	3CLpro	9	8	-5.06
3CLpro	22	1	-5.73	3CLpro	13	6	-5.48	3CLpro	38	62	-5.28	3CLpro	35	19	-5.06
3CLpro	21	9	-5.72	3CLpro	13	10	-5.48	3CLpro	38	60	-5.28	3CLpro	35	17	-5.06
3CLpro	21	8	-5.72	3CLpro	13	4	-5.48	3CLpro	38	63	-5.28	3CLpro	27	5	-5.05
3CLpro	5	1	-5.70	3CLpro	13	13	-5.48	3CLpro	38	64	-5.28	3CLpro	27	6	-5.05
3CLpro	20	3	-5.67	3CLpro	13	5	-5.48	3CLpro	38	59	-5.28	3CLpro	27	7	-5.05
3CLpro	20	6	-5.67	3CLpro	13	9	-5.48	3CLpro	38	61	-5.28	3CLpro	27	8	-5.05
3CLpro	20	4	-5.67	3CLpro	13	3	-5.48	3CLpro	24	7	-5.27	3CLpro	35	15	-5.05
3CLpro	20	2	-5.67	3CLpro	6	1	-5.47	3CLpro	24	2	-5.27	3CLpro	35	16	-5.05
3CLpro	20	5	-5.67	3CLpro	6	2	-5.47	3CLpro	24	4	-5.27	3CLpro	18	43	-5.03
3CLpro	20	7	-5.67	3CLpro	8	36	-5.47	3CLpro	24	9	-5.27	3CLpro	18	46	-5.03
3CLpro	20	1	-5.67	3CLpro	8	37	-5.47	3CLpro	24	1	-5.27	3CLpro	18	41	-5.03
3CLpro	20	46	-5.67	3CLpro	8	35	-5.47	3CLpro	24	6	-5.27	3CLpro	18	45	-5.03
3CLpro	20	42	-5.67	3CLpro	28	13	-5.47	3CLpro	24	8	-5.27	3CLpro	18	42	-5.03
3CLpro	20	45	-5.67	3CLpro	28	6	-5.47	3CLpro	24	10	-5.27	3CLpro	18	44	-5.03
3CLpro	20	40	-5.67	3CLpro	28	14	-5.47	3CLpro	24	5	-5.27	3CLpro	18	47	-5.03

3CLpro	20	44	-5.67	3CLpro	28	7	-5.47	3CLpro	24	3	-5.27	3CLpro	35	22	-5.03
3CLpro	20	41	-5.67	3CLpro	28	16	-5.47	3CLpro	38	58	-5.26	3CLpro	51	7	-5.03
3CLpro	20	47	-5.67	3CLpro	28	10	-5.47	3CLpro	38	56	-5.26	3CLpro	51	10	-5.03
3CLpro	20	43	-5.67	3CLpro	28	11	-5.47	3CLpro	38	57	-5.26	3CLpro	51	9	-5.03
3CLpro	28	2	-5.66	3CLpro	28	8	-5.47	3CLpro	38	53	-5.26	3CLpro	51	8	-5.03
3CLpro	28	3	-5.66	3CLpro	28	9	-5.47	3CLpro	38	54	-5.26	3CLpro	37	1	-5.02
3CLpro	28	1	-5.66	3CLpro	28	15	-5.47	3CLpro	38	55	-5.26	3CLpro	37	2	-5.02
3CLpro	28	5	-5.66	3CLpro	28	12	-5.47	3CLpro	20	89	-5.25	3CLpro	25	35	-5.01
3CLpro	28	4	-5.66	3CLpro	23	10	-5.46	3CLpro	20	90	-5.25	3CLpro	25	31	-5.01
3CLpro	21	3	-5.64	3CLpro	23	9	-5.46	3CLpro	38	49	-5.24	3CLpro	25	32	-5.01
3CLpro	21	1	-5.64	3CLpro	23	8	-5.46	3CLpro	38	45	-5.24	3CLpro	25	34	-5.01
3CLpro	21	2	-5.64	3CLpro	23	7	-5.46	3CLpro	38	43	-5.24	3CLpro	25	33	-5.01
3CLpro	21	4	-5.64	3CLpro	23	11	-5.46	3CLpro	38	47	-5.24	3CLpro	25	30	-5.01
3CLpro	20	50	-5.64	3CLpro	23	12	-5.46	3CLpro	38	44	-5.24	3CLpro	25	29	-5.01
3CLpro	20	48	-5.64	3CLpro	11	6	-5.46	3CLpro	15	8	-5.23	3CLpro	25	21	-5.01
3CLpro	20	52	-5.64	3CLpro	11	7	-5.46	3CLpro	15	9	-5.23	3CLpro	25	11	-5.01
3CLpro	20	49	-5.64	3CLpro	11	5	-5.46	3CLpro	15	10	-5.23	3CLpro	25	15	-5.01
3CLpro	20	53	-5.64	3CLpro	11	8	-5.46	3CLpro	38	72	-5.23	3CLpro	25	13	-5.01
3CLpro	20	51	-5.64	3CLpro	3	3	-5.45	3CLpro	38	70	-5.23	3CLpro	25	9	-5.01
3CLpro	21	12	-5.63	3CLpro	3	4	-5.45	3CLpro	38	74	-5.23	3CLpro	25	17	-5.01
3CLpro	21	13	-5.63	3CLpro	3	5	-5.45	3CLpro	19	1	-5.22	3CLpro	25	19	-5.01
3CLpro	26	1	-5.62	3CLpro	3	1	-5.45	3CLpro	19	2	-5.22	3CLpro	55	3	-5.00
3CLpro	20	58	-5.62	3CLpro	3	2	-5.45	3CLpro	19	3	-5.22	3CLpro	55	2	-5.00
3CLpro	20	57	-5.62	3CLpro	3	6	-5.45	3CLpro	35	21	-5.22	3CLpro	55	1	-5.00
3CLpro	20	54	-5.62	3CLpro	14	23	-5.42	3CLpro	35	18	-5.22				
3CLpro	20	55	-5.62	3CLpro	14	24	-5.42	3CLpro	35	20	-5.22				
3CLpro	20	56	-5.62	3CLpro	14	21	-5.42	3CLpro	20	26	-5.22				
3CLpro	20	36	-5.59	3CLpro	14	20	-5.42	3CLpro	20	25	-5.22				

**ANEXO B - TABELA COM TODOS OS VALORES DE ENERGIA DE INTERAÇÃO
DOS DERIVADOS DA MOLÉCULA BLBLD D2**

Tabela com os valores de rescoring dos derivados da molécula BLBLD D2 (energias < 3.5 kcal/mol)															
Receptor		Grupo	Ligante	Energia kcal/mol	Receptor		Grupo	Ligante	Energia kcal/mol	Receptor		Grupo	Ligante	Energia kcal/mol	
Receptor	Grupo				Receptor	Grupo				Receptor	Grupo				
3CLpro	7	4	-5.59	3CLpro	67	4	-4.08	3CLpro	9	125	-3.89	3CLpro	9	119	-3.72
3CLpro	7	7	-5.59	3CLpro	67	3	-4.08	3CLpro	9	126	-3.89	3CLpro	9	121	-3.72
3CLpro	7	1	-5.59	3CLpro	67	2	-4.08	3CLpro	9	124	-3.89	3CLpro	9	122	-3.72
3CLpro	7	8	-5.59	3CLpro	6	7	-4.08	3CLpro	9	185	-3.89	3CLpro	9	120	-3.72
3CLpro	7	2	-5.59	3CLpro	6	6	-4.08	3CLpro	9	184	-3.89	3CLpro	9	118	-3.72
3CLpro	7	5	-5.59	3CLpro	6	8	-4.08	3CLpro	9	181	-3.89	3CLpro	7	11	-3.71
3CLpro	7	3	-5.59	3CLpro	6	5	-4.08	3CLpro	9	183	-3.89	3CLpro	31	2	-3.71
3CLpro	7	6	-5.59	3CLpro	27	1	-4.06	3CLpro	9	28	-3.89	3CLpro	31	5	-3.71
3CLpro	62	2	-5.32	3CLpro	34	2	-4.05	3CLpro	9	29	-3.89	3CLpro	31	3	-3.71
3CLpro	72	2	-5.24	3CLpro	34	1	-4.05	3CLpro	9	32	-3.89	3CLpro	31	4	-3.71
3CLpro	72	3	-5.24	3CLpro	34	5	-4.05	3CLpro	9	31	-3.89	3CLpro	31	1	-3.71
3CLpro	72	4	-5.24	3CLpro	34	4	-4.05	3CLpro	9	33	-3.89	3CLpro	51	39	-3.71
3CLpro	72	1	-5.24	3CLpro	34	3	-4.05	3CLpro	9	27	-3.89	3CLpro	51	42	-3.71
3CLpro	62	5	-5.24	3CLpro	5	10	-4.02	3CLpro	9	30	-3.89	3CLpro	51	40	-3.71
3CLpro	62	4	-5.23	3CLpro	73	5	-4.02	3CLpro	9	26	-3.89	3CLpro	51	41	-3.71
3CLpro	62	3	-5.19	3CLpro	73	1	-4.02	3CLpro	9	144	-3.88	3CLpro	9	164	-3.70
3CLpro	62	1	-5.17	3CLpro	73	3	-4.02	3CLpro	9	134	-3.88	3CLpro	9	151	-3.70
3CLpro	62	6	-5.14	3CLpro	73	2	-4.02	3CLpro	9	140	-3.88	3CLpro	9	168	-3.70
3CLpro	61	11	-4.89	3CLpro	73	4	-4.02	3CLpro	9	146	-3.88	3CLpro	9	154	-3.70
3CLpro	61	10	-4.89	3CLpro	73	6	-4.02	3CLpro	5	18	-3.88	3CLpro	56	2	-3.70
3CLpro	61	9	-4.87	3CLpro	9	61	-4.01	3CLpro	12	1	-3.88	3CLpro	56	5	-3.70
3CLpro	61	7	-4.87	3CLpro	9	62	-4.01	3CLpro	1	31	-3.87	3CLpro	56	6	-3.70
3CLpro	61	5	-4.87	3CLpro	9	73	-4.01	3CLpro	1	32	-3.87	3CLpro	56	4	-3.70
3CLpro	61	6	-4.87	3CLpro	9	57	-4.01	3CLpro	9	137	-3.87	3CLpro	56	3	-3.70
3CLpro	61	8	-4.87	3CLpro	9	77	-4.01	3CLpro	9	143	-3.87	3CLpro	56	1	-3.70
3CLpro	52	1	-4.87	3CLpro	9	69	-4.01	3CLpro	9	133	-3.87	3CLpro	9	87	-3.69
3CLpro	61	16	-4.85	3CLpro	9	78	-4.01	3CLpro	9	148	-3.87	3CLpro	9	89	-3.69
3CLpro	61	14	-4.85	3CLpro	9	68	-4.01	3CLpro	5	22	-3.87	3CLpro	9	90	-3.69
3CLpro	61	15	-4.85	3CLpro	9	10	-4.01	3CLpro	9	114	-3.86	3CLpro	9	88	-3.69
3CLpro	61	12	-4.85	3CLpro	9	13	-4.01	3CLpro	9	113	-3.86	3CLpro	9	91	-3.69
3CLpro	61	13	-4.85	3CLpro	9	12	-4.01	3CLpro	9	117	-3.86	3CLpro	3	43	-3.68
3CLpro	60	3	-4.81	3CLpro	9	17	-4.01	3CLpro	9	115	-3.86	3CLpro	3	41	-3.68
3CLpro	60	1	-4.81	3CLpro	9	14	-4.01	3CLpro	9	116	-3.86	3CLpro	3	42	-3.68
3CLpro	60	2	-4.81	3CLpro	9	11	-4.01	3CLpro	6	91	-3.86	3CLpro	3	44	-3.68
3CLpro	37	1	-4.79	3CLpro	9	15	-4.01	3CLpro	59	3	-3.85	3CLpro	68	3	-3.68
3CLpro	37	2	-4.79	3CLpro	9	16	-4.01	3CLpro	59	1	-3.85	3CLpro	42	2	-3.66
3CLpro	37	3	-4.79	3CLpro	5	16	-4.01	3CLpro	59	6	-3.85	3CLpro	9	153	-3.65
3CLpro	2	1	-4.77	3CLpro	5	13	-4.01	3CLpro	59	9	-3.85	3CLpro	9	150	-3.65
3CLpro	2	2	-4.77	3CLpro	5	14	-4.01	3CLpro	59	5	-3.85	3CLpro	9	163	-3.65
3CLpro	49	25	-4.77	3CLpro	5	15	-4.01	3CLpro	59	8	-3.85	3CLpro	9	167	-3.65
3CLpro	49	24	-4.77	3CLpro	9	5	-4.00	3CLpro	59	4	-3.85	3CLpro	38	27	-3.65
3CLpro	49	26	-4.77	3CLpro	9	3	-4.00	3CLpro	59	7	-3.85	3CLpro	38	29	-3.65
3CLpro	37	5	-4.76	3CLpro	9	2	-4.00	3CLpro	59	2	-3.85	3CLpro	38	28	-3.65
3CLpro	37	6	-4.76	3CLpro	9	7	-4.00	3CLpro	9	138	-3.84	3CLpro	38	30	-3.65
3CLpro	37	4	-4.76	3CLpro	9	8	-4.00	3CLpro	9	149	-3.84	3CLpro	9	170	-3.65
3CLpro	43	4	-4.63	3CLpro	9	9	-4.00	3CLpro	9	132	-3.84	3CLpro	9	166	-3.65
3CLpro	43	2	-4.63	3CLpro	9	4	-4.00	3CLpro	9	129	-3.84	3CLpro	9	152	-3.65
3CLpro	43	5	-4.63	3CLpro	9	6	-4.00	3CLpro	1	27	-3.83	3CLpro	9	161	-3.65
3CLpro	43	7	-4.63	3CLpro	5	21	-3.99	3CLpro	1	22	-3.83	3CLpro	9	131	-3.64
3CLpro	43	6	-4.63	3CLpro	9	112	-3.99	3CLpro	1	25	-3.83	3CLpro	9	135	-3.64

3CLpro	43	8	-4.63	3CLpro	9	108	-3.99	3CLpro	1	30	-3.83	3CLpro	9	136	-3.64
3CLpro	43	9	-4.63	3CLpro	9	110	-3.99	3CLpro	1	29	-3.83	3CLpro	9	147	-3.64
3CLpro	43	1	-4.63	3CLpro	9	109	-3.99	3CLpro	1	21	-3.83	3CLpro	1	47	-3.63
3CLpro	43	3	-4.63	3CLpro	9	111	-3.99	3CLpro	1	26	-3.83	3CLpro	1	42	-3.63
3CLpro	75	2	-4.58	3CLpro	9	49	-3.98	3CLpro	1	28	-3.83	3CLpro	1	43	-3.63
3CLpro	75	6	-4.58	3CLpro	9	53	-3.98	3CLpro	1	24	-3.83	3CLpro	1	46	-3.63
3CLpro	75	5	-4.58	3CLpro	9	51	-3.98	3CLpro	1	23	-3.83	3CLpro	1	44	-3.63
3CLpro	75	1	-4.58	3CLpro	9	52	-3.98	3CLpro	9	37	-3.82	3CLpro	1	45	-3.63
3CLpro	75	4	-4.58	3CLpro	9	50	-3.98	3CLpro	9	40	-3.82	3CLpro	68	1	-3.63
3CLpro	75	3	-4.58	3CLpro	9	54	-3.98	3CLpro	9	36	-3.82	3CLpro	9	182	-3.63
3CLpro	75	7	-4.58	3CLpro	9	55	-3.98	3CLpro	9	34	-3.82	3CLpro	9	179	-3.63
3CLpro	39	3	-4.54	3CLpro	9	56	-3.98	3CLpro	9	39	-3.82	3CLpro	9	177	-3.63
3CLpro	39	1	-4.54	3CLpro	9	187	-3.97	3CLpro	9	1	-3.82	3CLpro	3	38	-3.61
3CLpro	39	7	-4.54	3CLpro	9	188	-3.97	3CLpro	9	38	-3.82	3CLpro	3	37	-3.61
3CLpro	39	4	-4.54	3CLpro	9	186	-3.97	3CLpro	9	35	-3.82	3CLpro	3	35	-3.61
3CLpro	39	5	-4.54	3CLpro	9	189	-3.97	3CLpro	3	14	-3.82	3CLpro	3	40	-3.61
3CLpro	39	2	-4.54	3CLpro	57	9	-3.95	3CLpro	3	16	-3.82	3CLpro	3	36	-3.61
3CLpro	39	6	-4.54	3CLpro	57	5	-3.95	3CLpro	3	11	-3.82	3CLpro	3	39	-3.61
3CLpro	61	4	-4.53	3CLpro	57	6	-3.95	3CLpro	3	13	-3.82	3CLpro	31	7	-3.60
3CLpro	61	2	-4.53	3CLpro	57	7	-3.95	3CLpro	3	15	-3.82	3CLpro	31	6	-3.60
3CLpro	61	1	-4.53	3CLpro	57	2	-3.95	3CLpro	3	12	-3.82	3CLpro	31	9	-3.60
3CLpro	61	3	-4.53	3CLpro	57	8	-3.95	3CLpro	3	17	-3.82	3CLpro	31	8	-3.60
3CLpro	5	17	-4.47	3CLpro	57	3	-3.95	3CLpro	9	83	-3.81	3CLpro	31	10	-3.60
3CLpro	5	11	-4.38	3CLpro	57	1	-3.95	3CLpro	9	81	-3.81	3CLpro	9	176	-3.60
3CLpro	44	6	-4.35	3CLpro	57	4	-3.95	3CLpro	9	85	-3.81	3CLpro	9	175	-3.60
3CLpro	44	5	-4.35	3CLpro	9	94	-3.95	3CLpro	9	86	-3.81	3CLpro	9	180	-3.60
3CLpro	44	1	-4.35	3CLpro	9	93	-3.95	3CLpro	9	80	-3.81	3CLpro	9	178	-3.60
3CLpro	44	2	-4.35	3CLpro	9	98	-3.95	3CLpro	9	79	-3.81	3CLpro	3	30	-3.58
3CLpro	44	4	-4.35	3CLpro	9	99	-3.95	3CLpro	9	82	-3.81	3CLpro	3	29	-3.58
3CLpro	44	3	-4.35	3CLpro	9	103	-3.95	3CLpro	9	84	-3.81	3CLpro	3	32	-3.58
3CLpro	52	11	-4.33	3CLpro	9	105	-3.95	3CLpro	9	101	-3.80	3CLpro	3	31	-3.58
3CLpro	63	3	-4.22	3CLpro	9	107	-3.95	3CLpro	9	104	-3.80	3CLpro	3	33	-3.58
3CLpro	63	8	-4.22	3CLpro	9	96	-3.95	3CLpro	9	102	-3.80	3CLpro	3	34	-3.58
3CLpro	63	5	-4.22	3CLpro	56	11	-3.94	3CLpro	9	100	-3.80	3CLpro	9	160	-3.57
3CLpro	63	6	-4.22	3CLpro	56	8	-3.94	3CLpro	9	95	-3.80	3CLpro	9	159	-3.57
3CLpro	50	2	-4.22	3CLpro	56	12	-3.94	3CLpro	9	97	-3.80	3CLpro	9	162	-3.57
3CLpro	50	3	-4.22	3CLpro	56	10	-3.94	3CLpro	9	92	-3.80	3CLpro	9	169	-3.57
3CLpro	50	1	-4.22	3CLpro	56	9	-3.94	3CLpro	9	106	-3.80	3CLpro	9	157	-3.57
3CLpro	50	4	-4.22	3CLpro	56	7	-3.94	3CLpro	9	46	-3.80	3CLpro	9	156	-3.57
3CLpro	66	4	-4.19	3CLpro	36	1	-3.94	3CLpro	9	48	-3.80	3CLpro	9	165	-3.57
3CLpro	66	3	-4.19	3CLpro	36	5	-3.94	3CLpro	9	45	-3.80	3CLpro	9	155	-3.57
3CLpro	66	2	-4.19	3CLpro	36	6	-3.94	3CLpro	9	42	-3.80	3CLpro	9	158	-3.57
3CLpro	66	1	-4.19	3CLpro	36	2	-3.94	3CLpro	9	44	-3.80	3CLpro	38	19	-3.57
3CLpro	5	12	-4.16	3CLpro	36	4	-3.94	3CLpro	9	41	-3.80	3CLpro	8	3	-3.56
3CLpro	3	8	-4.13	3CLpro	36	3	-3.94	3CLpro	9	47	-3.80	3CLpro	63	1	-3.55
3CLpro	3	9	-4.13	3CLpro	1	34	-3.94	3CLpro	9	43	-3.80	3CLpro	63	4	-3.55
3CLpro	3	7	-4.13	3CLpro	1	33	-3.94	3CLpro	9	70	-3.80	3CLpro	63	7	-3.55
3CLpro	3	6	-4.13	3CLpro	1	39	-3.94	3CLpro	9	66	-3.80	3CLpro	63	2	-3.55
3CLpro	6	3	-4.13	3CLpro	1	38	-3.94	3CLpro	9	60	-3.80	3CLpro	6	11	-3.54
3CLpro	6	4	-4.13	3CLpro	1	37	-3.94	3CLpro	9	63	-3.80	3CLpro	11	23	-3.54
3CLpro	6	1	-4.13	3CLpro	1	35	-3.94	3CLpro	9	58	-3.80	3CLpro	11	22	-3.54
3CLpro	6	2	-4.13	3CLpro	1	40	-3.94	3CLpro	9	72	-3.80	3CLpro	11	24	-3.54
3CLpro	5	20	-4.13	3CLpro	1	41	-3.94	3CLpro	9	67	-3.80	3CLpro	11	1	-3.54
3CLpro	5	19	-4.13	3CLpro	1	36	-3.94	3CLpro	9	74	-3.80	3CLpro	3	52	-3.54
3CLpro	5	2	-4.13	3CLpro	5	23	-3.92	3CLpro	57	13	-3.73	3CLpro	3	53	-3.54
3CLpro	3	3	-4.11	3CLpro	1	2	-3.91	3CLpro	57	14	-3.73	3CLpro	3	51	-3.54
3CLpro	3	4	-4.11	3CLpro	1	8	-3.91	3CLpro	57	15	-3.73	3CLpro	3	50	-3.54
3CLpro	3	5	-4.11	3CLpro	1	9	-3.91	3CLpro	57	16	-3.73	3CLpro	19	1	-3.53
3CLpro	3	1	-4.11	3CLpro	1	7	-3.91	3CLpro	57	10	-3.73	3CLpro	19	2	-3.53
3CLpro	3	2	-4.11	3CLpro	1	3	-3.91	3CLpro	57	11	-3.73	3CLpro	19	3	-3.53
3CLpro	6	12	-4.11	3CLpro	1	4	-3.91	3CLpro	57	12	-3.73	3CLpro	3	48	-3.53
3CLpro	6	11	-4.11	3CLpro	1	6	-3.91	3CLpro	9	172	-3.72	3CLpro	3	46	-3.53

3CLpro	6	9	-4.11	3CLpro	1	1	-3.91	3CLpro	9	173	-3.72	3CLpro	3	45	-3.53
3CLpro	6	10	-4.11	3CLpro	1	10	-3.91	3CLpro	9	171	-3.72	3CLpro	3	47	-3.53
3CLpro	5	1	-4.09	3CLpro	1	5	-3.91	3CLpro	9	174	-3.72	3CLpro	6	41	-3.52
3CLpro	5	7	-4.08	3CLpro	3	10	-3.90	3CLpro	9	25	-3.72	3CLpro	3	21	-3.52
3CLpro	5	6	-4.08	3CLpro	9	75	-3.89	3CLpro	9	21	-3.72	3CLpro	3	20	-3.52
3CLpro	5	3	-4.08	3CLpro	9	64	-3.89	3CLpro	9	20	-3.72	3CLpro	3	22	-3.52
3CLpro	5	9	-4.08	3CLpro	9	65	-3.89	3CLpro	9	19	-3.72	3CLpro	3	18	-3.52
3CLpro	5	4	-4.08	3CLpro	9	71	-3.89	3CLpro	9	23	-3.72	3CLpro	3	19	-3.52
3CLpro	5	5	-4.08	3CLpro	9	76	-3.89	3CLpro	9	24	-3.72	3CLpro	8	1	-3.51
3CLpro	5	8	-4.08	3CLpro	9	59	-3.89	3CLpro	9	22	-3.72	3CLpro	65	5	-3.5
3CLpro	67	1	-4.08	3CLpro	9	123	-3.89	3CLpro	9	18	-3.72	3CLpro	42	1	-3.5