

MATERIAL SUPLEMENTAR

Planejamento de fármacos contra Covid-19: uma experiência de ensino remoto de química farmacêutica

Rhanna Victória Amaral da Silva^{a,*}, Larissa Magno Monteiro^a, Carlos Henrique Lamego Guimarães Thomaz Branco^a e Fernanda Guilhaon-Simplicio^a

^aFaculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 69080-900
Manaus – AM, Brasil

*e-mail: rhanna_rasta@hotmail.com

1. Download do alvo molecular

1.1. Crie, na área de trabalho, uma nova pasta reservada para realização do *docking* (como exemplo: Pasta X). A Figura 1S demonstra esse processo;

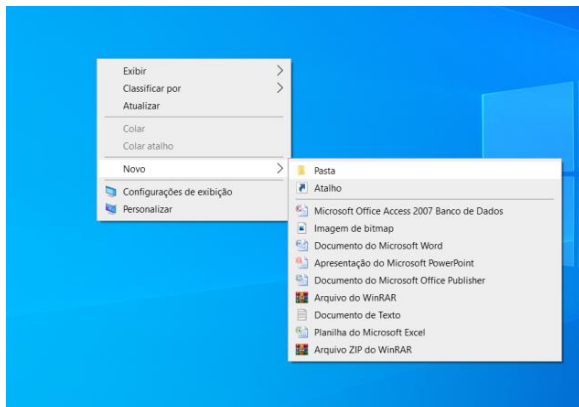


Figura 1S. Criação da Pasta X na área de trabalho

1.2 Acesse o PDB (<https://www.rcsb.org/>) e faça o download das estruturas cristalográficas das proteínas escolhidas no formato pdb, como mostra a Figura 2S;

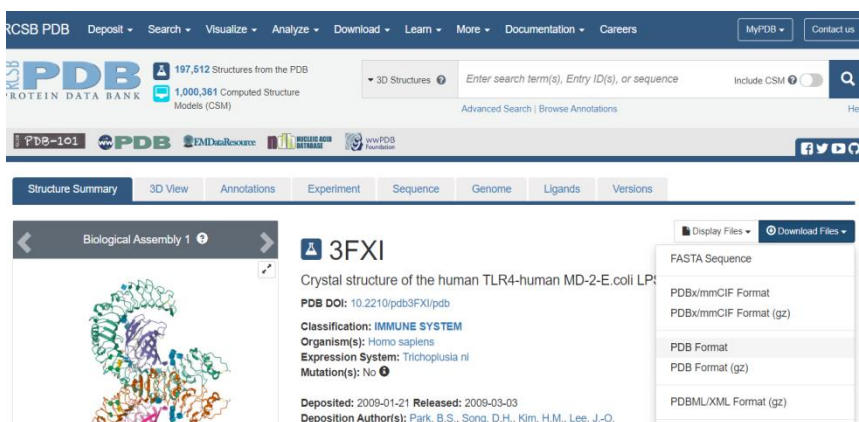


Figura 2S. Página inicial do PDB para busca e download de proteínas no formato pdb

1.3. Adicione o arquivo à Pasta X.

2. Desenho dos ligantes

2.1. Abra o programa ChemSketch e clique em *Draw Normal*;

2.2. Selecione os elementos ou grupamentos químicos, presentes nas laterais da tela, conforme a estrutura química do ligante planejado (Figura 3S);

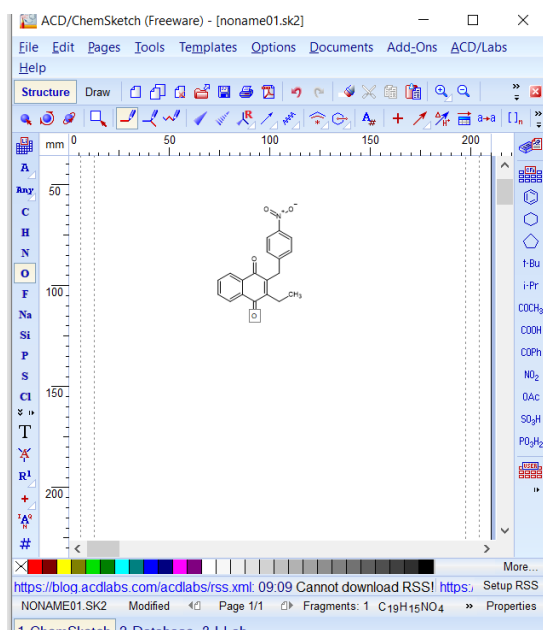


Figura 3S. Desenho dos derivados pelo software ChemSketch

2.3. Após o desenho da molécula, clique em *File > Save as* e salve o arquivo em formato mol2 na Pasta X (Figura 4S);

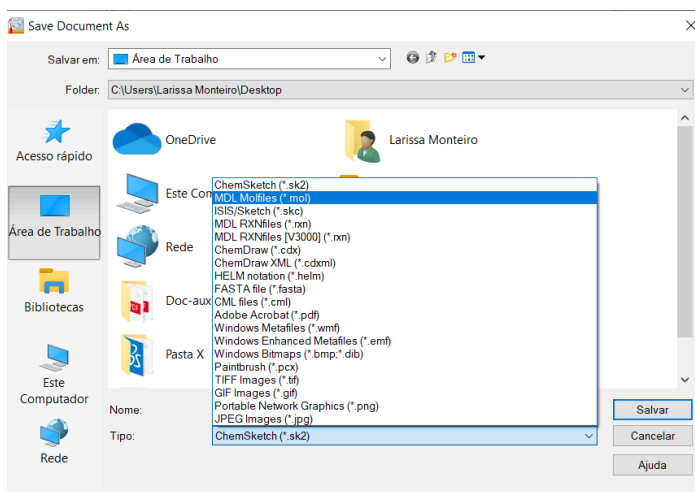


Figura 4S. Seleção do formato adequado para salvar o arquivo

2.4. Em seguida, abra o programa Avogadro e, na barra cinza, clique em *Open*;

2.5. Selecione o arquivo do ligante na Pasta X, e na barra de ferramentas, clique em *Extensions > Optimize Geometry* (Figura 5S);

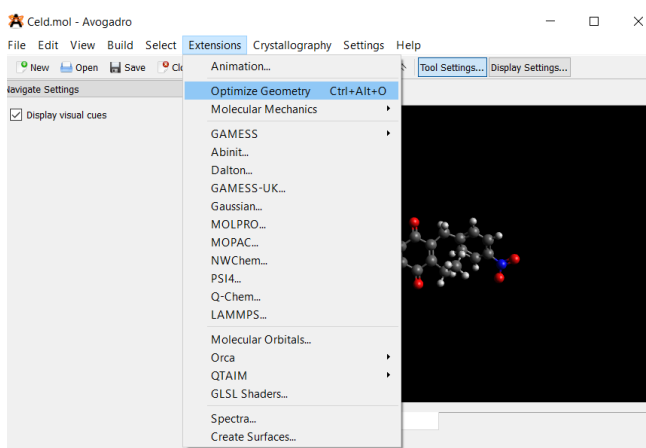


Figura 5S. Aplicação do campo de força UFF para otimizar a geometria da molécula

2.6. Após isto, clique em *File > Save as* e salve o arquivo em formato pdb na Pasta X (Figura 6S);

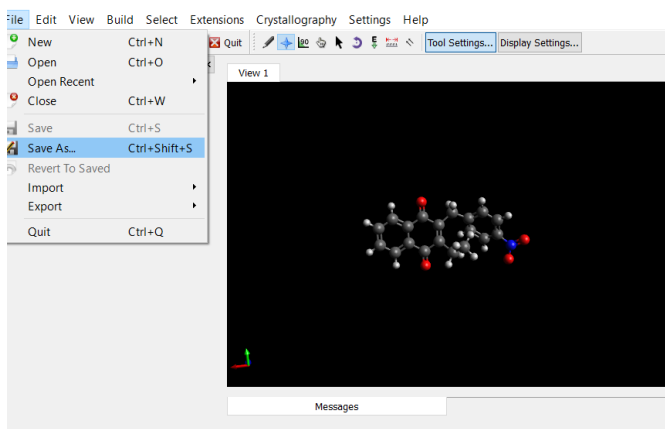


Figura 6S. Obtenção dos derivados no formato pdb

3. Preparo do alvo

3.1. Abra o programa AutoDock Tools, clique na pasta azul que se encontra no canto superior esquerdo e selecione o arquivo da enzima em formato pdb (Figura 7S);

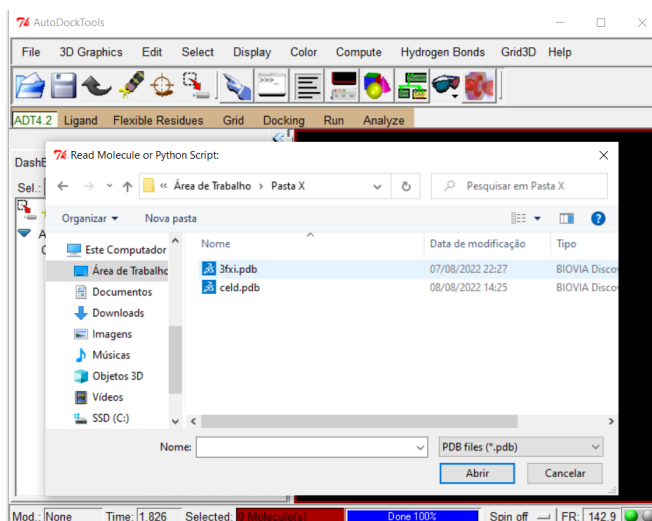


Figura 7S. Escolha do alvo em formato pdb

3.2. Para excluir moléculas de água, na barra de ferramentas clique em *Edit > Delete Water* (Figura 8S);

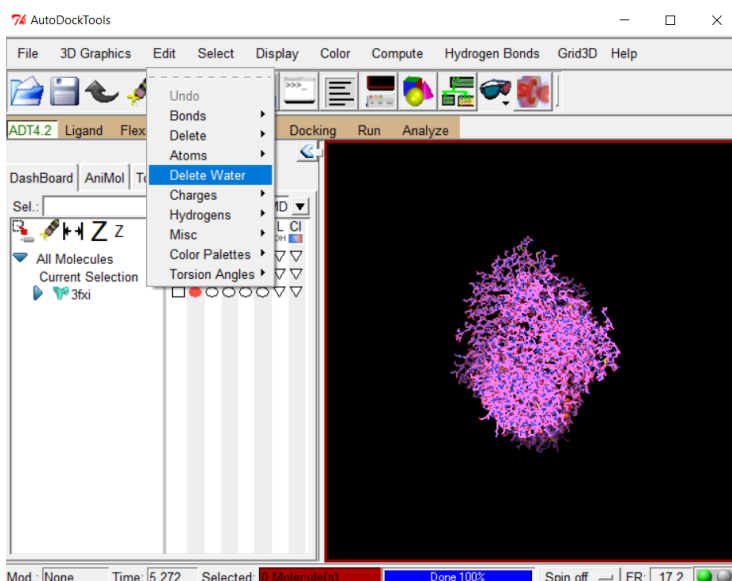


Figura 8S. Exclusão da água da macromolécula

3.3. Para excluir o ligante co-cristalizado, clique na aba *Select* e selecione *Select From String*, e abrirá uma nova janela. Nesta, clique em *Residue Sets > Ligand > Add > Dismiss*. Após, selecione a aba *Edit > Delete > Delete Selected Atoms > Continue* (Figura 9S);

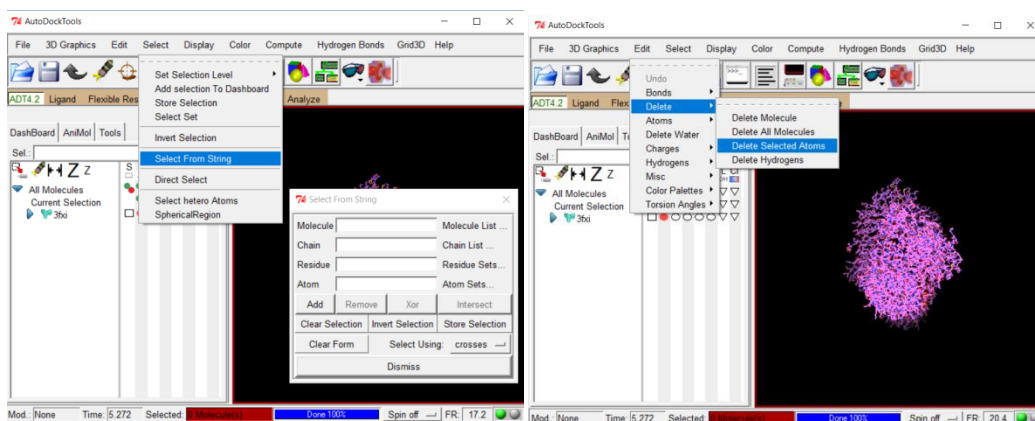


Figura 9S. Exclusão do ligante co-cristalizado

3.4. Para adição de hidrogênios, clique em *Edit > Hydrogens > Add > Ok*. Novamente clique em *Edit > Hydrogens* e selecione *Merge Non Polar* (Figura 10S);

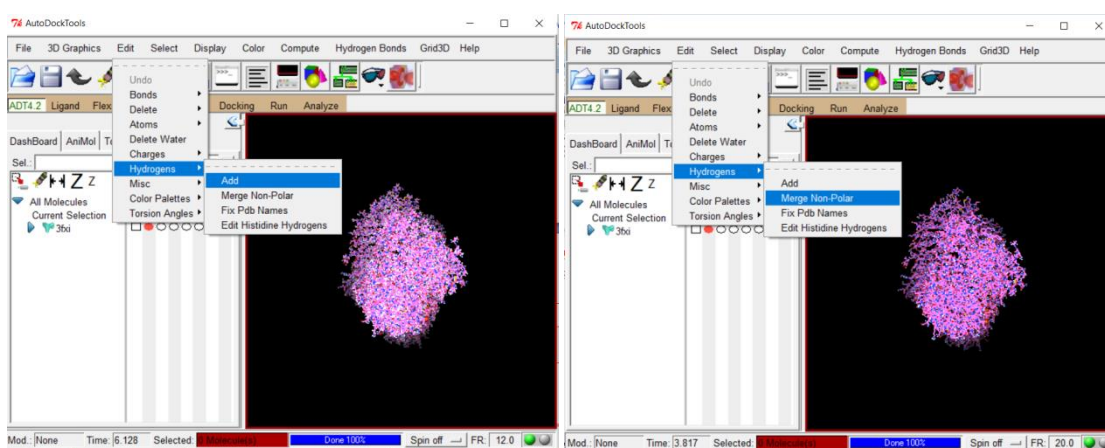


Figura 10S. Retirada dos átomos de hidrogênio da macromolécula

3.5. Para salvar a enzima em formato pdbqt, na barra de cor marrom, clique em *Grid > Macromolecule > Choose*. Uma nova janela será aberta, busque pela proteína, clique em *Select Molecule > Ok* (Figura 11S);

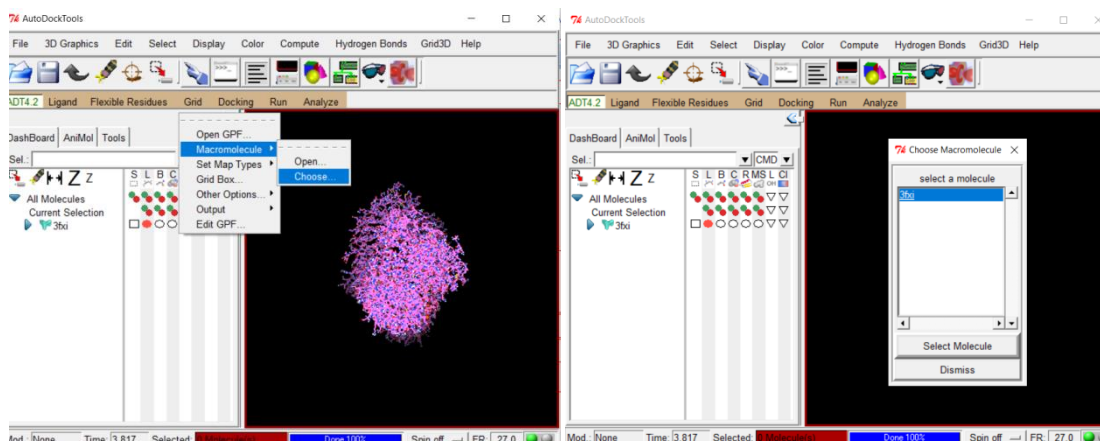


Figura 11S. Obtenção do alvo no formato pdbqt

3.6. A proteína deve ser salva na Pasta X.

4. Preparo dos ligantes

4.1. Abra o programa AutoDock Tools e, na barra marrom clique em *Ligand > Input > Open* e procure o ligante em formato pdb (Figura 12S);

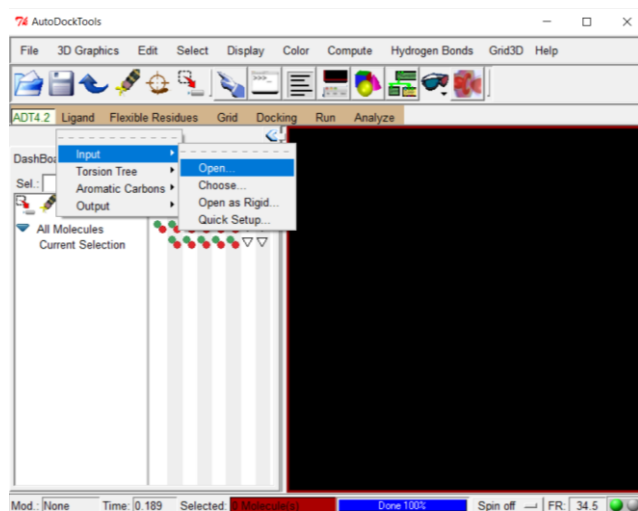


Figura 12S. Adição do derivado no AutoDock Tools

4.2. Clique novamente em *Ligand > Output > Save as PDBQT* (Figura 13S);

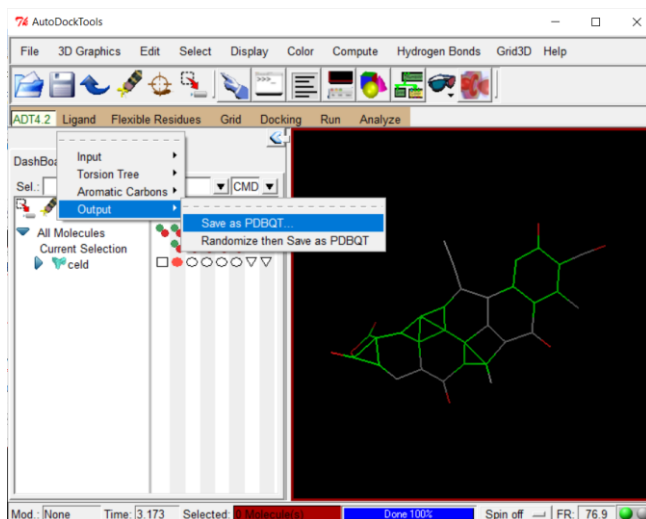


Figura 13S. Obtenção do ligante em formato pdbqt

4.3. O arquivo deve ser salvo na Pasta X e o procedimento deverá ser feito para cada um dos ligantes individualmente.

5. Definição dos parâmetros da caixa

5.1. Abra o programa AutoDock Tools e na barra marrom clique em *Grid* > *Macromolecule* > *Open* e procure a proteína no formato pdbqt (Figura 14S);

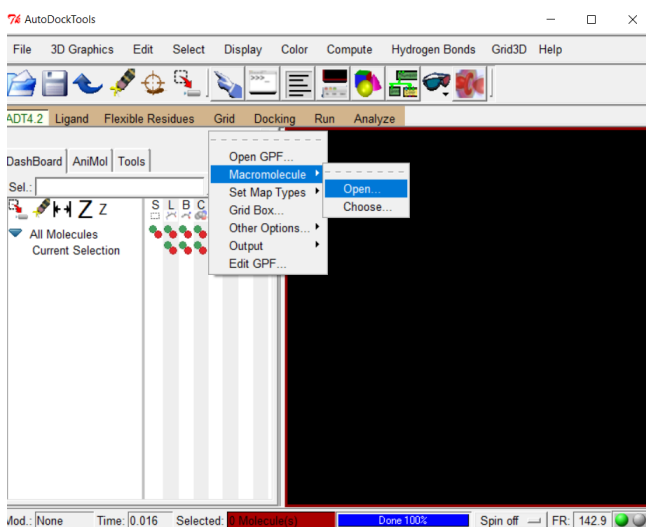


Figura 14S. Adição da proteína alvo ao AutoDock Tools

5.2. Na lateral esquerda, clicar na seta azul ao lado do nome da proteína e selecionar os resíduos de aminoácidos identificados como constituintes do sítio ativo (Figura 15S);

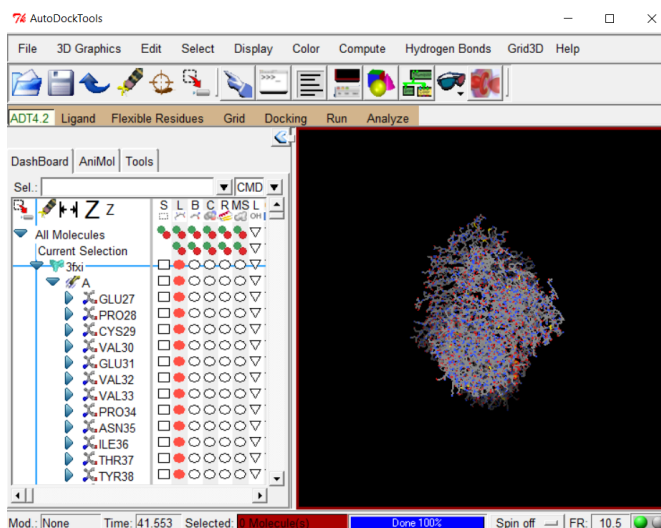


Figura 15S. Seleção dos aminoácidos que compõe o sítio ativo da proteína alvo

5.3. Na barra marrom, clique em *Grid > Grid Box* e a janela *Grid Options* será aberta (Figura 16S);

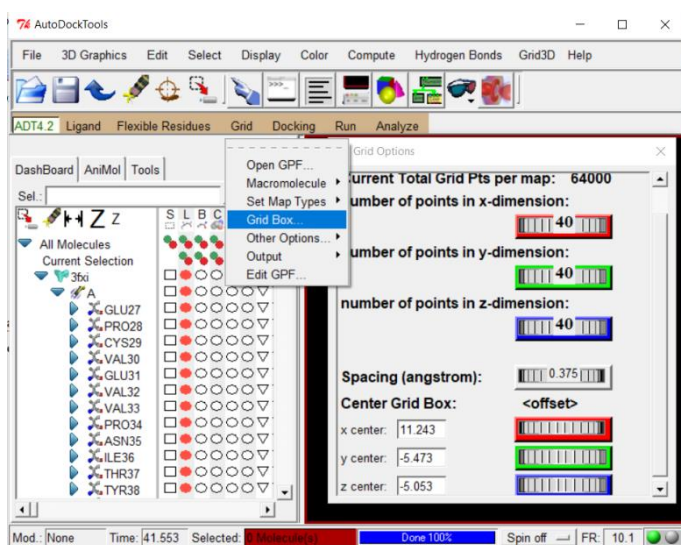


Figura 16S. Obtenção dos parâmetros da caixa

5.4. Manipule as dimensões e o centro da caixa, aumentando ou diminuindo os valores de X, Y e Z. Posicione a caixa de forma a incorporar somente os resíduos de aminoácidos do sítio ativo (Figura 17S);

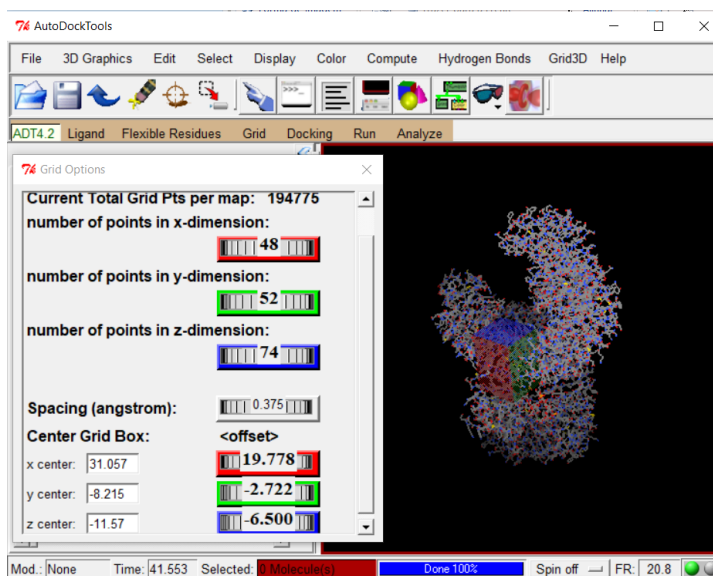


Figura 17S. Valores das dimensões e coordenadas da caixa

5.5. Anote as coordenadas X, Y e Z do centro e das dimensões da caixa.

6. Procedimento para *docking* do ligante e alvo molecular

6.1. Abra o Explorador de Arquivos, clique em Este Computador e, em seguida, no Disco local (C:);

6.2. Abra a subpasta Arquivos de Programas (x86), clique em *The Scripps Research Institute* e depois em *Vina* (Figura 18S);

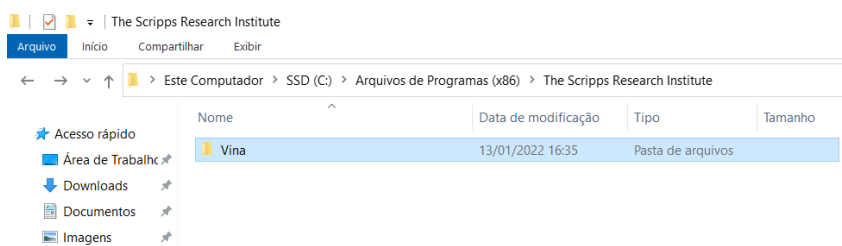


Figura 18S. Caminho a ser percorrido até a pasta *Vina*

6.3. Ao abrir a subpasta, copie os arquivos *Vina* e *Vina split*, e cole na Pasta X (Figura 19S);

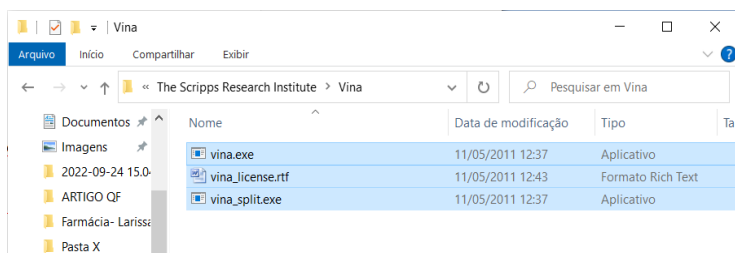


Figura 19S. Arquivos que devem ser adicionados à Pasta X

6.4. Crie o arquivo de configuração para o *docking* no Bloco de Notas, Wordpad, Gedit ou outro editor de texto, preenchendo as informações conforme a Figura 20S;

6.5. Salve em formato txt, com o nome “conf”, e copie o arquivo para a Pasta X. É importante salientar que para cada ligante diferente deverá ser feito um arquivo “conf” diferente.

conf.txt - Bloco de Notas

Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda

```
receptor = nomeproteína.pdbqt
ligand = nomeligante.pdbqt
out = nomeproteína_out.pdbqt

center_x = 00.000
center_y = 00.000
center_z = 00.000
size_x = 10
size_y = 10
size_z = 10

exhaustiveness = 10
```

Figura 20S. Template do arquivo “conf” contendo o nome do alvo, do ligante e as dimensões da gridbox

6.6. Utilize o seguinte atalho no teclado do seu computador Windows + R e uma janela de conversa será aberta;

6.7. Digite “cmd” na caixa, clique na tecla *Enter* e, assim, a janela do *prompt* de comando aparecerá (Figura 21S);

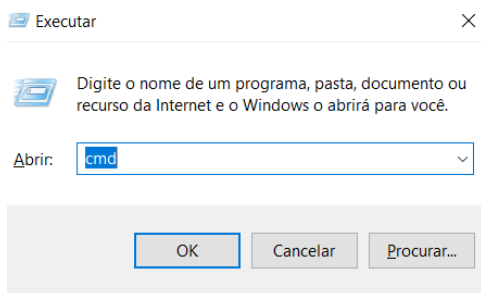


Figura 21S. Abertura do prompt de comando

6.8. Copie o caminho da Pasta X (Figura 22S);

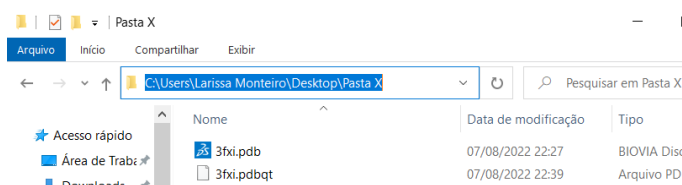


Figura 22S. Caminho da Pasta X

6.9. Dentro do *prompt* de comando digite “cd” e, em seguida, cole o caminho da pasta e clique em *Enter*, o que permitirá a identificação do caminho da pasta com os arquivos do *docking* conforme a Figura 23S;

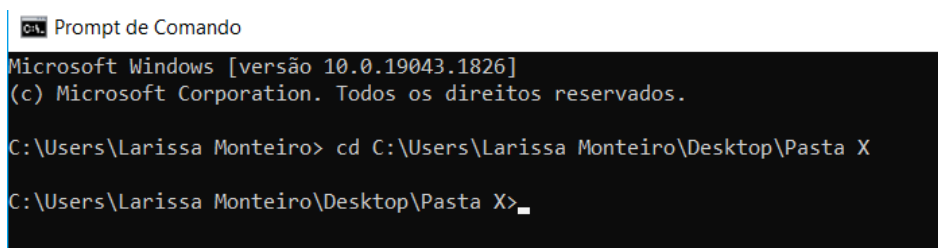


Figura 23S. Localização da pasta com os arquivos para *docking*

6.10. Copie e cole na tela o comando `vina --config conf.txt --log log.txt` e clique novamente na tecla *Enter*. Isso promoverá a execução do *docking* mediante o AutoDock Vina, como mostra a Figura 24S. Caso necessário, use o comando `vina.exe` em vez de `vina`;

A

```

Microsoft Windows [versão 10.0.19043.1826]
(c) Microsoft Corporation. Todos os direitos reservados.

C:\Users\Larissa Monteiro> cd C:\Users\Larissa Monteiro\Desktop\Pasta X
C:\Users\Larissa Monteiro\Desktop\Pasta X>vina --config conf.txt --log log.txt
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:
#
# O. Trott, A. J. Olson,
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking
# with a new scoring function, efficient optimization and
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010)
# 455-461
#
# DOI 10.1002/jcc.21334
#
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.
#
#####
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -2094658904
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****

```

B

```

# Please see http://vina.scripps.edu for more information
#####
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -2094658904
Performing search ...
done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
1      -0.0      0.000      0.000
2      -0.0      5.151      7.802
3      -0.0      9.560     12.860
4      -0.0      8.166     11.058
5      -0.0      8.229     11.012
6      -0.0      8.736     11.803
7      -0.0      7.909      9.817
8      -0.0      6.089      8.734
9      -0.0      8.344     10.231
Writing output ... done.

```

Figura 24S. Aplicação do comando de execução no prompt. (A) Porcentagem das análises já realizadas pelo software AutoDock Vina para conclusão do docking molecular. (B) Resultados obtidos em termos de energia de ligação

6.11. O arquivo de saída *docking_out.pdbqt* reúne todas as poses num único arquivo. Para separá-las em arquivos diferentes, use o comando *vina_split --input docking_out.pdbqt*, ajustando o nome *docking_out* para o nome do arquivo correspondente. Se houver necessidade, use o comando *vina_split.exe* em vez de *vina_split* (Figura 25S).

```

C:\Users\Larissa Monteiro\Desktop\Pasta X>vina_split --input 3fxi_out.pdbqt
Prefix for ligands will be 3fxi_out_ligand_
Prefix for flexible side chains will be 3fxi_out_flex_

C:\Users\Larissa Monteiro\Desktop\Pasta X>

```

Figura 25S. Separação das poses após uso do comando *vina_split --input 3fxi_out.pdbqt*

7. Análise dos resultados

7.1. Abra o programa Discovery Studio, e na barra de ferramentas, clique em *File > Open* e selecione a proteína enzima utilizada no *docking* em formato *pdbqt*, presente na Pasta X (Figura 26S);

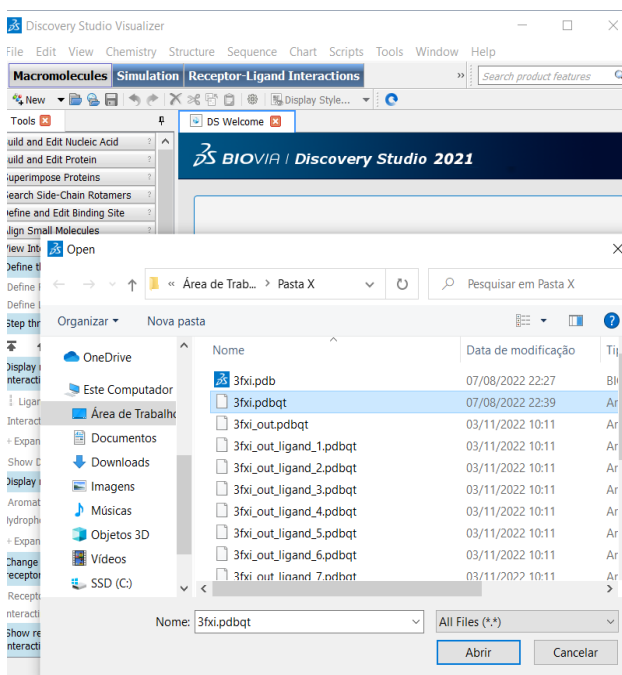


Figura 26S. Adição da proteína em formato pdbqt no Discovery Studio

7.2. No lado esquerdo, no limite da tela do visualizador, clique na seta “>”, aparecerá uma janela lateral, então clique no código da proteína (Figura 27S);

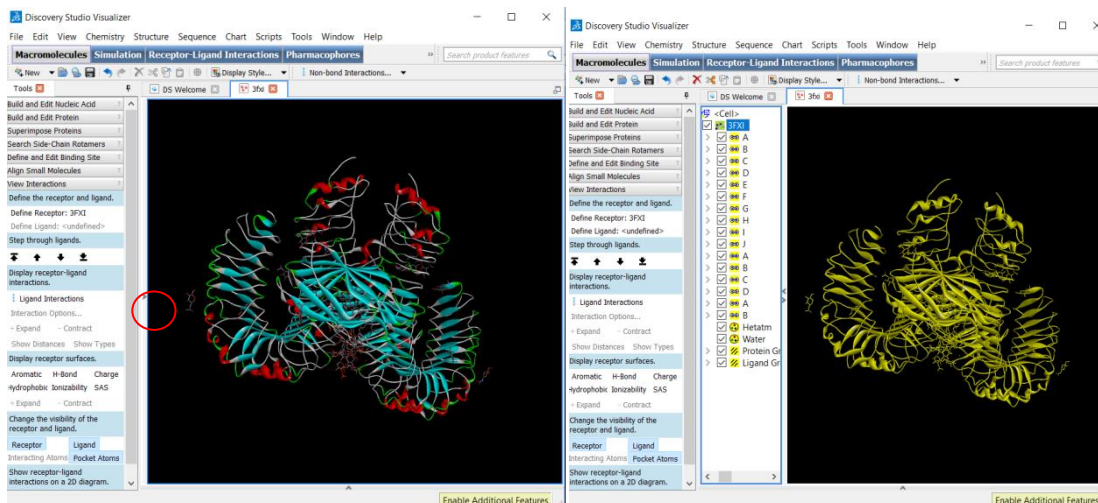


Figura 27S. Seleção da proteína

7.3. À esquerda na janela *Tools*, clique em *View Interactions* > *Define Receptor* (Figura 28S);

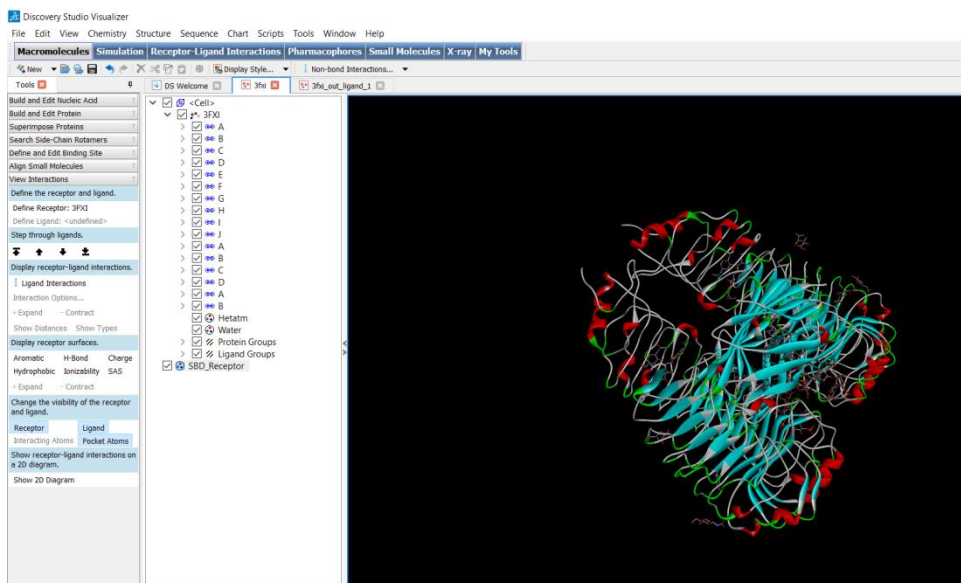


Figura 28S. Definição da proteína selecionada como receptor no Discovery Studio

7.4. Na barra de ferramentas clique em *File > Open*, escolha um resultado dos dockings em formato pdbqt para análise, selecione o resultado e na aba *Tools* clique em *Define Ligand* (Figura 29S);

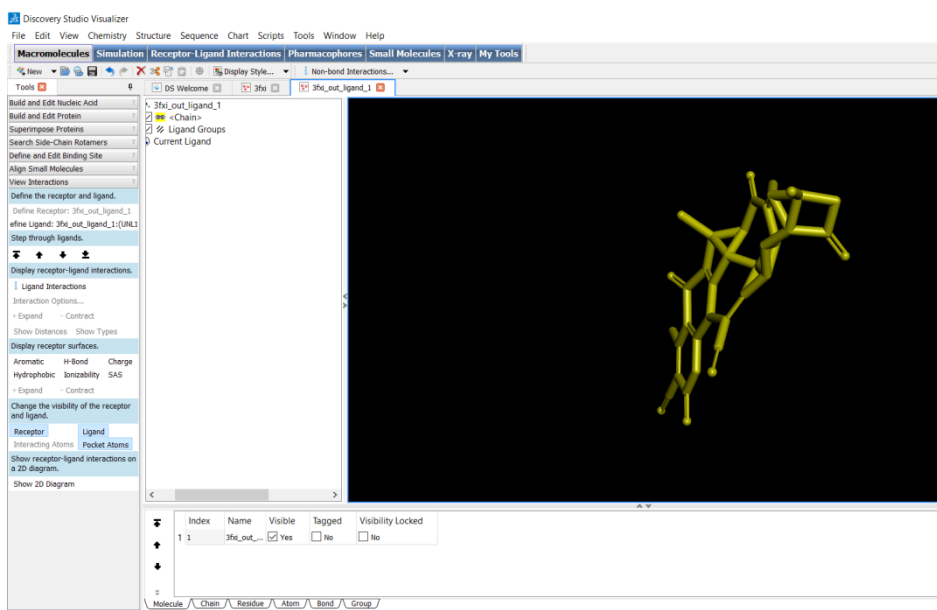


Figura 29S. Adição da melhor pose, do ligante, à proteína no Discovery Studio

7.5. Na janela lateral, clique no código do ligante, copie e cole na janela onde está a enzima (Figura 30S);

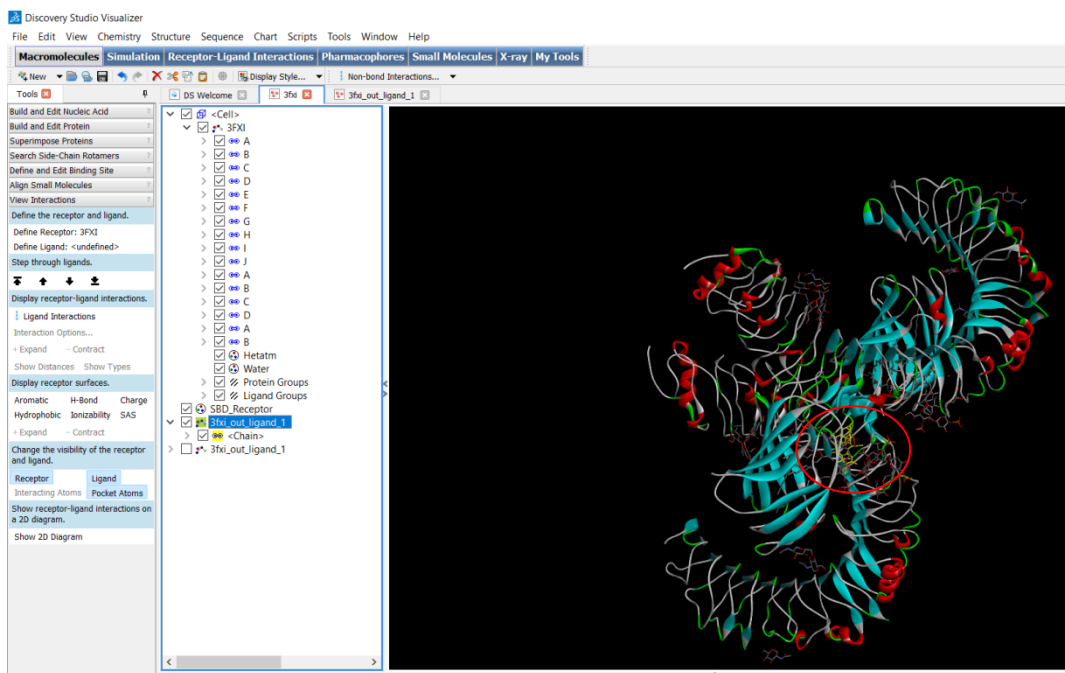


Figura 20S. Introdução do derivado no sitio ativo da proteína

- 7.6. Na janela lateral, clique no código do ligante que foi inserido e na aba *Tools* selecione a opção *View Interactions* > *Define Ligand* (Figura 31S);
- 7.7. Ainda na aba *Tools*, clicar em *Ligand Interactions* > *Show 2D Diagram* e analise os resultados comparando com as energias de ligação (Figura 32S).

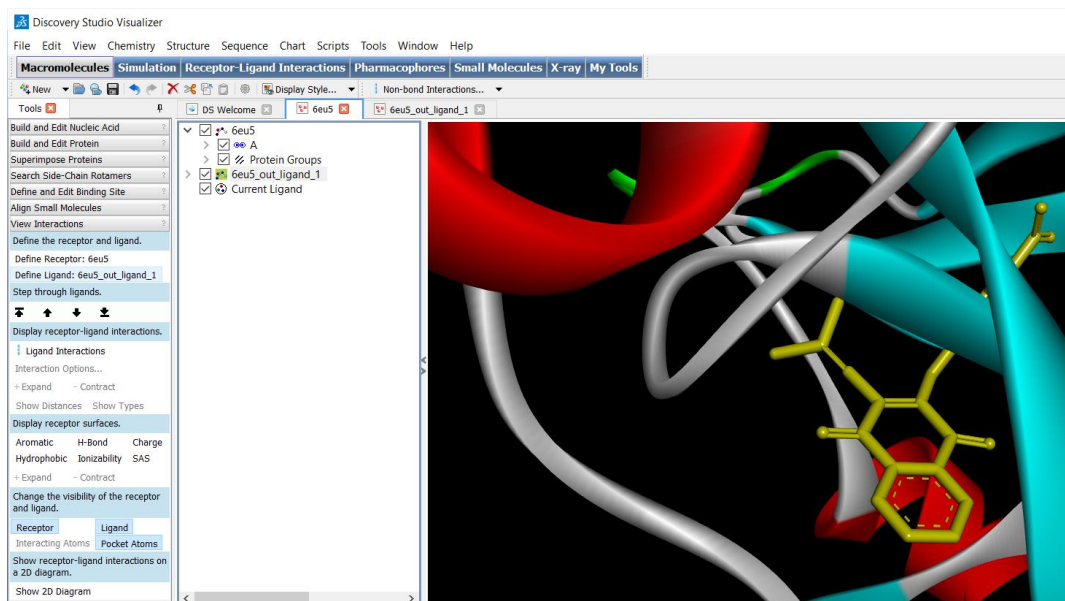


Figura 31S. Definição da pose gerada no docking, do ligante com a proteína e definição das interações no Discovery Studio

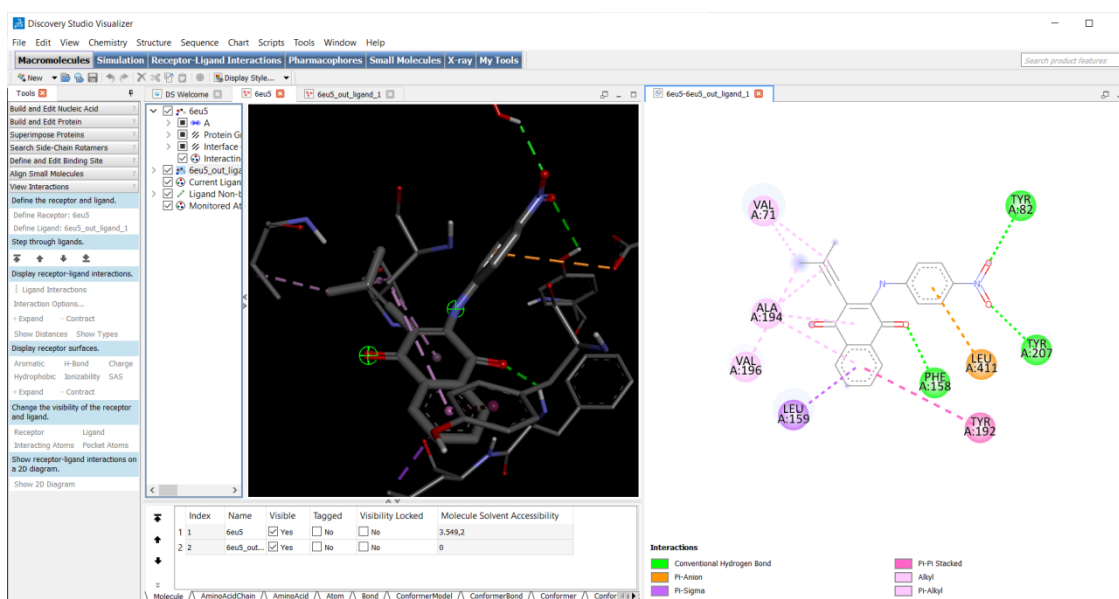


Figura 32S. Exemplo de interações intermoleculares entre os aminoácidos do sítio ativo de uma proteína e um ligante, visualizadas no Discovery Studio