



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DÉBORA BRÍGIDA MOURA DE FREITAS

**DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DE RODANINA E TIAZOLIDINA
FRENTE A ALFA-HEMOLISINA DE *Staphylococcus aureus***

Recife

2022

DÉBORA BRÍGIDA MOURA DE FREITAS

**DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DE RODANINA E TIAZOLIDINA
FRENTE A ALFA-HEMOLISINA DE *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dijanah Cota Machado

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Moura de Freitas, Débora Brígida.

Docking molecular de derivados de rodanina e tiazolidina frente à alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* / Débora Brígida Moura de Freitas. - Recife, 2022.

55 : il., tab.

Orientador(a): Dijanah Cota Machado

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, apêndices.

1. Docking molecular. 2. Alfa-hemolisina. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Tiazolidina. 5. Rodanina. I. Cota Machado, Dijanah. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

Débora Brígida Moura de Freitas

**DOCKING MOLECULAR DE DERIVADOS DE RODANINA E TIAZOLIDINA
FRENTE A ALFA-HEMOLISINA DE *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Pernambuco, Campus Recife, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

Nota: _____

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Dijanah Cota Machado
Departamento de Biofísica e Radiobiologia - UFPE

Prof. Me. Jeann Fabiann Branco Júnior
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino - UFPE

Prof. Me. Artur Alves Rodrigues da Silva
Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco - Dr. Oleg Krasilnikov - UFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus familiares por todo o apoio prestado, especialmente à minha mãe Ana e a minha irmã Kalina por sempre terem acreditado em mim e me incentivado em todos os momentos.

Ao Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco – Dr. Oleg Krasilnikov, por ter me acolhido e por ter sido o lugar onde pude aprender, evoluir todos os meus conhecimentos e onde iniciei a minha trajetória científica, em especial à minha amiga de laboratório e extensão Isabel Cavalcanti, que desde o início caminhou comigo me dando todo o apoio.

Ao professor Cláudio Gabriel Rodrigues pelas orientações de Iniciação Científica e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento em meus projetos PIBIC.

À professora Dijanah Cota Machado por todo o estímulo, orientação e empatia.

A todos os meus colegas do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, em especial a Paulo Ricardo, Gleyci Machado, Victor Alves, Igor César, Leonardo Oliveira, Ingrid Andrêssa e Viviane Kelly por todos os trabalhos em grupo e momentos compartilhados.

À Anna Cláudia por sempre ter me incentivado e ter sido uma ótima amiga em todos os momentos. Aos meus “biomigos” queridos João Victor Macário, Geisa Maria e Tainah Guerra por terem sido o meu primeiro e permanente grupo do curso, onde pude compartilhar não apenas sobre minha vida acadêmica como também vários momentos de amizade e admiração.

Às minhas gatas Minerva e Jiji por terem me feito companhia durante toda a escrita do TCC, tornando meus dias mais leves.

Por fim, agradeço ao meu inspirador parceiro de vida e caminhada científica Franklin Ferreira por todo o carinho, estímulo em momentos difíceis e por toda a vida compartilhada.

RESUMO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria gram-positiva que produz toxinas de alta virulência, como as toxinas formadoras de poros. Dentre elas, destaca-se a alfa-hemolisina (α -HL), uma proteína monomérica de 33 kDa, solúvel em água, que é secretada por 95% das cepas de *S. aureus* durante o seu crescimento exponencial. A α -HL é responsável por formar poros proteicos não seletivos na membrana do hospedeiro, responsável por intensas respostas inflamatórias, desequilíbrios osmóticos com o influxo de Ca^{2+} e efluxo de K^{+} e perda de ATP, resultando na lise celular. No hospedeiro, a presença desta toxina no meio extracelular, aliada a outros fatores de virulência, facilita a infecção estafilocócica, demonstrando-se um grande desafio na antibioticoterapia, principalmente por esta bactéria ser responsável por infecções hospitalares, além de favorecer o surgimento de cepas resistentes a várias classes de antibióticos, inclusive os de última geração. Por esse motivo, o presente estudo visou testar computacionalmente por meio do *docking* molecular possíveis bloqueadores dessa toxina baseados em derivados da rodanina (AG-55, AG-58 e AG-104) e tiazolidina (GQ-294, GQ-310 e GQ-443) com o intuito de obter alternativas farmacológicas que possam inibir a progressão da infecção estafilocócica. O *docking* molecular é uma ferramenta *in silico* amplamente utilizada para avaliar computacionalmente a interação entre receptores e ligantes, permitindo testar a afinidade entre moléculas antes mesmo de realizar estudos experimentais, sendo de grande importância na descoberta de novos fármacos. Os resultados de *docking* demonstraram que o ligante AG-55 foi o que apresentou maior afinidade com a proteína, especificamente na região de constrição ou anelar (-7.129 kcal/mol), recebendo destaque os aminoácidos glutamato 111, lisina 147 e metionina 113. Por esse motivo, o AG-55 poderia ser um bom candidato a bloqueador do poro protéico formado pela α -HL. Além disso, o ligante AG-55 apresentou duas ligações de hidrogênio, que são interações consideradas fortes se comparadas às demais intermoleculares. Os demais ligantes interagiram na região troncular predominantemente por meio de ligações de hidrogênio, todas envolvendo resíduos do aminoácido asparagina. Esse resultado preditivo contribui com o entendimento das possíveis atuações desses candidatos a fármacos e em futuros estudos de bloqueadores da alfa-hemolisina.

Palavras-chave: *Docking* molecular. Alfa-hemolisina. *Staphylococcus aureus*. Tiazolidina. Rodanina.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is a gram-positive bacterium that produces highly virulent toxins, such as pore-forming toxins. Among them, alpha-hemolysin (α -HL), a water-soluble monomeric protein with 33 kDa, which is secreted by 95% of *S. aureus* strains during exponential growth, stands out. α -HL is responsible for forming non-selective protein pores in the host membrane, responsible for intense inflammatory responses, osmotic imbalances with the influx of Ca^{2+} and efflux of K^{+} and loss of ATP, resulting in cell lysis. In the host, the presence of this toxin in the extracellular environment, combined with other virulence factors, facilitates staphylococcal infection, demonstrating a great challenge in antibiotic therapy, mainly because this bacterium is responsible for hospital infections, in addition to favoring the emergence of resistant strains. to several classes of antibiotics, including the last generation ones. For this reason, the present study aimed to computationally test, through molecular docking, possible blockers of this toxin based on rhodanine derivatives (AG-55, AG-58 and AG-104) and thiazolidine (GQ-294, GQ-310 and GQ- 443) in order to obtain pharmacological alternatives that can inhibit the progression of staphylococcal infection. Molecular docking is a widely used in silico tool to computationally evaluate the interaction between receptors and ligands, allowing to test the affinity between molecules even before carrying out experimental studies, being of great importance in the discovery of new drugs. The docking results showed that the ligand AG-55 showed the highest affinity with the protein, specifically in the constriction or ring region (-7.129 kcal/mol), with emphasis on the amino acids glutamate 111, lysine 147 and methionine 113. For this reason, AG-55 could be a good candidate to block the protein pore formed by α -HL. In addition, the AG-55 ligand presented two hydrogen bonds, which are interactions considered strong when compared to the other intermolecular ones. The other ligands interacted in the trunk region predominantly through hydrogen bonds, all involving residues of the amino acid asparagine. This predictive result contributes to the understanding of the possible actions of these drug candidates and to future studies of alpha-hemolysin blockers.

Keywords: Molecular docking. Alpha-hemolysin. *Staphylococcus aureus*. Thiazolidine. Rhodanine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
2.1 Caracterização, resistência bacteriana e fatores de virulência.....	9
2.2 Características da alfa-hemolisina de <i>S. aureus</i>	11
2.3 Compostos derivados de tiazolidina e rodanina.....	13
2.4 Aplicação do <i>docking</i> molecular na farmacologia.....	15
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Obtenção dos candidatos a fármacos.....	20
4.2 Simulação computacional.....	21
4.2.1 Desenho dos compostos tiazolidínicos.....	21
4.2.2 Otimização de energia dos compostos tiazolidínicos.....	21
4.2.3 Obtenção e tratamento da estrutura cristalográfica da alfa-hemolisina.....	21
4.2.4 Definição dos sítios de ligação da alfa-hemolisina.....	21
4.2.5 <i>Docking</i> molecular.....	22
4.2.6 Análise dos resultados.....	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Resultados do <i>docking</i> molecular (rodanina).....	25
5.1.1 LPFS/AG-55.....	25
5.1.2 LPFS/AG-58.....	26
5.1.3 LPFS/AG-104.....	27
5.2 Resultados do <i>docking</i> molecular (tiazolidina).....	29
5.2.1 LPSF/GQ-294.....	29
5.2.2 LPSF/GQ-310.....	30
5.2.3 LPFS/GQ-443.....	31
5.3 Resumo das interações obtidas no <i>docking</i> molecular.....	33
5.3.1 Resultado do ranqueamento dos melhores ligantes.....	33
5.3.2 Resumo das interações dos ligantes com o poro da alfa-hemolisina.....	34
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE A- Complexo canal α-HL/AG-55.....	50
APÊNDICE B- Complexo canal α-HL/AG-58.....	51
APÊNDICE C- Complexo canal α-HL/AG-104.....	52
APÊNDICE D- Complexo canal α-HL/GQ-294.....	53
APÊNDICE E- Complexo canal α-HL/GQ-310.....	54
APÊNDICE F- Complexo canal α-HL/GQ-443.....	55

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria gram-positiva que possui a morfologia arredondada denominada coco, sendo seu grupamento do tipo estafilococo. É uma espécie que faz parte da microbiota humana, colonizando a pele e as cavidades nasais. Contudo, pode apresentar-se como um patógeno oportunista e estar associado tanto a infecções simples como espinhas e furúnculos, quanto a manifestações clínicas mais graves, como pneumonia, endocardite, meningite, osteomielite, síndrome do choque tóxico e sepse (LEW; WALDVOGEL, 2004; BECKER *et al.*, 2015; COHEN *et al.*, 2016; KWIECINSKI; HORSWILL, 2020; ALHURAYRI *et al.*, 2021). O surgimento de cepas resistentes e os fatores de virulência demonstram-se grandes desafios no tratamento farmacológico (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Alguns fatores atrelados à resistência têm sido alarmantes, como a formação de biofilmes. Os biofilmes são agregados microbianos sésseis de espessura variada e com alto grau de organização presentes em superfícies. As bactérias imersas no biofilme possuem mecanismos de resistência diferentes se comparados ao nível de uma bactéria isolada, tornando-as mais resistentes (PENESYAN; GILLINGS; PAULSEN, 2015). Nessas circunstâncias, as defesas imunológicas são ineficazes, fazendo com que as infecções adquiram caráter crônico. O *S. aureus* também apresenta outros mecanismos que podem agravar os quadros de infecção, como os fatores de virulência. A produção de toxinas, por exemplo, possui um importante papel no avanço das infecções, pois são secretadas pelas bactérias e afetam diretamente o hospedeiro (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Dentre os grupos de toxinas, destacam-se as formadoras de poros, sendo divididas em α -hemolisina (α -toxina), β -hemolisina, leucotoxinas e modulinas solúveis em fenol (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Um grande destaque de toxina formadora de poros pode ser dado à α -hemolisina (α -HL), uma proteína monomérica de 33 kDa, solúvel em água, que é secretada por 95% das cepas de *S. aureus* durante o seu crescimento exponencial (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). A presença desta toxina altera as respostas inflamatórias, secreção de citocinas e sinalização celular (GOUAUX *et al.*, 1994; SEILIE; WARDENBURG, 2017). Alguns estudos têm demonstrado, inclusive, que através da formação dos biofilmes a α -HL pode ser secretada para atingir células importantes como os macrófagos (SCHERR *et al.*, 2015).

A oligomerização de sete protômeros da α -HL na membrana celular do hospedeiro forma um poro proteico (canal iônico) com estrutura β -barril. Sua capacidade de formar poros

permite a passagem livre de moléculas entre o meio intra e extracelular, aumentando a permeabilidade da membrana causando desequilíbrios osmóticos e consequente lise celular (MELO *et al.*, 2016). A α -HL pode afetar variados tipos celulares, como as células epiteliais, endoteliais, linfócitos T, monócitos e macrófagos (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). Porém, é a sua capacidade hemolítica que tem recebido grande destaque devido a uma maior predisposição à formação de poros em hemácias (GOUAUX *et al.*, 1994; MELO *et al.*, 2016). Por esse motivo, faz-se necessário o estudo de novos fármacos com a propriedade de bloquear a ação da toxina e evitar a formação de danos às membranas celulares a fim de trazer novas opções de tratamento.

Nesse contexto, os derivados da tiazolidina demonstram-se uma boa alternativa para inibir a formação de poros da α -HL, pois possuem importantes aplicabilidades farmacológicas como a antibiofilme (HAMMAD *et al.*, 2020) e antimicrobiana (KHAN *et al.*, 2020), incluindo cepas multirresistentes (TOMASIC *et al.*, 2010). Outros derivados, como os da rodanina, também demonstram-se eficazes antimicrobianos, incluindo para cepas de *S. aureus* resistente à metilicina (SARM) e resistente à vancomicina (VRSA) (ABDELKHALEK *et al.*, 2016; KRÁTKÝ; VINŠOVÁ; STOLAŘÍKOVÁ, 2017).

Uma forma de se estudar a interação entre proteínas e candidatos a fármacos é através de estudos *in silico* envolvendo ferramentas de *docking* molecular, que permitem avaliar as interações e afinidade entre ligantes e receptores antes mesmo de realizar testes experimentais. Trata-se de uma abordagem computacional e de baixo custo, sendo de grande importância na descoberta de novos fármacos (FAN, 2021). Considerando esses fatores, o presente estudo visa investigar com a ferramenta *in silico* de *docking* molecular a atividade bloqueadora de derivados tiazolidínicos e rodanínicos candidatos a fármacos frente à α -HL de *S. aureus*, com o intuito de obter alternativas de antibioticoterapia de forma a inibir a progressão da infecção estafilocócica, uma vez que esta toxina representa um forte fator de virulência da bactéria.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Caracterização, resistência bacteriana e fatores de virulência

Por ser uma bactéria gram-positiva, o *S. aureus* possui a parede celular composta por uma única membrana lipídica contendo uma espessa camada de peptidoglicano, responsável por dar rigidez à parede celular. Além disso, possui o ácido lipoteicoico ancorado por diacilglicerol, responsável por conferir carga negativa à superfície celular (KNOX; WICKEN, 1973; SHOCKMAN; BARREN, 1983; WILKINSON, 1997). Por fim, possui proteínas de superfície, exoproteínas e autolisinas (HARRIS *et al.*, 2002). Foi descoberta pela primeira vez em 1884 pelo médico Anton Rosenbach (ROSENBAACH, 1884). Nessa mesma época, havia uma alta taxa de mortalidade em pacientes infectados por *S. aureus*, chegando a 82% de acordo com o *Boston City Hospital* (SKINNER; KEEFER, 1941; OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

Após o desenvolvimento da penicilina em 1928, houve diminuição dos casos de morte. No entanto, no início da década de 1950, surgiu o primeiro caso de cepas resistentes à penicilina. Na década de 1960 percebeu-se a resistência também à meticilina, dando origem às cepas denominadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM) (JEVONS, 1961). As cepas SARM eram associadas ao ambiente hospitalar, no entanto, a partir de 1990 foram consideradas presentes também na comunidade e em todo o mundo (STINEAR *et al.*, 2014). Até mesmo a vancomicina, antibiótico glicopeptídico considerado ideal para tratar as SARM, em algumas situações demonstrou-se insuficiente para os tratamentos, sendo relatada a existência de cepas resistentes aos antibióticos glicopeptídicos (GRSA) (KELMANI; RAJU; PATIL, 2008; HOWDEN *et al.*, 2010; MCGUINNESS; MALACHOWA; DELEO, 2017).

Através de estudos filogenéticos, foram descobertos genes responsáveis pela resistência a diferentes classes de drogas, sendo a transferência horizontal de genes do cassete cromossômico estafilocócico *mec* (SCC*mec*) um ponto crucial na resistência aos antibióticos (TURLEJ; HRYNIEWICZ, 2011; CHUA *et al.*, 2014). Além disso, há outros mecanismos de resistência, podendo ser citadas: 1) a inativação enzimática através de enzimas de degradação de antimicrobianos, associada principalmente à resistência às penicilinas e aos aminoglicosídeos; 2) a alteração do sítio de ação do alvo que diminui a afinidade por antibióticos como a vancomicina; 3) mecanismo de aprisionamento de antibióticos incluindo novamente a vancomicina e, também, a daptomicina; 4) bombas de efluxo, que conferem

resistência principalmente aos antibióticos fluoroquinolonas e tetraciclina (CHRISTAK; MARCOU; TOFARIDES, 2020).

A vancomicina é comumente usada para tratar essas infecções, pois é o antibiótico mais ativo contra as SARM. No entanto, sabe-se que há cepas resistentes à vancomicina, tornando as infecções por *S. aureus* mais difíceis de tratar (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). A capacidade do *S. aureus* de formar biofilmes, o surgimento de cepas multirresistentes e os fatores de virulência são as principais razões que determinam o desafio em lidar com essas infecções. A capacidade infecciosa do *S. aureus* e seu sucesso como patógeno está relacionado à expressão de fatores de virulência, dentre os quais se destaca a produção de uma grande variedade de toxinas que contribuem com a proliferação de *S. aureus* (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Por esse motivo, busca-se novas estratégias farmacológicas para conter os fatores de virulência e, conseqüentemente, as infecções causadas pelo *S. aureus*.

O *S. aureus* secreta toxinas altamente eficazes que auxiliam no crescimento bacteriano, sendo consideradas alvos atraentes para pesquisas científicas (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018). Os fatores de virulência são estratégias utilizadas pelas bactérias para driblar o hospedeiro, fazendo com que obtenham sucesso como patógenos (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Dentre os fatores de virulência de *S. aureus*, podem ser citadas as suas toxinas, que dividem-se em três grupos principais, como as toxinas esfoliativas, superantígenos e as toxinas formadoras de poros (OLIVEIRA; BORGES; SIMÕES, 2018).

As toxinas esfoliativas são epidermolíticas, pois hidrolisam caderinas desmossômicas e estão associadas à clivagem de junções de queratinócitos e adesão célula-célula na epiderme do hospedeiro, podendo induzir descamação da pele e formação de bolhas (BUKOWSKI; WLADYKA; DUBIN, 2010). Já os superantígenos incluem as chamadas enterotoxinas estafilocócicas, que podem causar sintomas de intoxicação alimentar como vômitos e diarreia (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Além disso, possuem mais de 23 toxinas descritas, recebendo destaque a toxina associada à síndrome do choque tóxico (TSST-1) (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000; GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014).

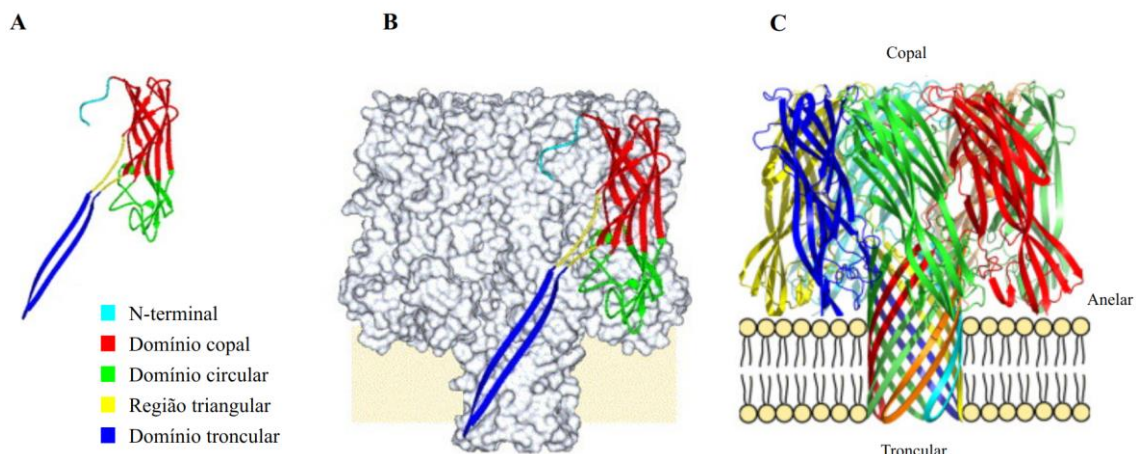
Por fim, há as toxinas formadoras de poros, que podem formar canais na membrana do hospedeiro e causar a degradação celular, podendo incluir quatro tipos de toxinas, denominadas α -hemolisina, β -hemolisina, leucotoxinas e modulinas solúveis em fenol (GRUMANN; NÜBEL; BRÖKER, 2014). Essas toxinas foram avaliadas em estudos com modelos de biofilmes que revelaram haver uma sinergia entre a α -hemolisina e a leucotoxina (LukAB) na indução de morte celular, algo que auxiliou o crescimento e a virulência de *S. aureus*. Ou seja,

essas toxinas juntamente com os biofilmes tornam ainda maiores os desafios para obter opções de tratamento farmacológico contra infecções causadas por *S. aureus* (SCHERR *et al.*, 2015).

2.2 Características da alfa-hemolisina de *S. aureus*

Entre as toxinas formadoras de poros, a alfa-hemolisina (α -HL) é o principal agente citotóxico, sendo secretada por 95% das cepas de *S. aureus*. Trata-se de uma proteína que forma um poro heptamérico transmembranar. Cada protômero apresenta 293 aminoácidos contendo aproximadamente 33 kDa, tendo as estruturas denominadas de *amino latch* (N-terminal), domínio β -sandwich (copal), *triangle region* (região triangular), e os domínios *rim* (anelar) e *prestem ou stem* (pré-troncular ou troncular) (Figura 1A). O domínio N-terminal de cada protômero (Figura 1A) liga-se à subunidade adjacente dentro do domínio copal e o domínio troncular no pré-poro e se desdobra para formar o β -barril transmembranar. Essa transformação é acompanhada por mudanças conformacionais dentro dos trechos de aminoácidos que cercam o domínio troncular no protômero e se tornam a região triangular, que conecta o barril ao domínio copal, formando o poro heptamérico (Figura 1B). Ou seja, os domínios N-terminal, a região triangular e o domínio troncular participam juntos na transição de pré-poro para poro (JAYASINGHE; MILES; BAYLEY, 2006).

Figura 1. Estrutura da α -hemolisina de *S. aureus*. A) representação das regiões do protômero da α -HL; B) canal proteico heptamérico formado pela α -HL, com destaque para um protômero que o compõe; C) canal inserido na membrana com a identificação das regiões *cap* (região copal), *rim* (região anelar) e *stem* (região troncular).



Fonte: Adaptado de Menestrina *et al.* (2003) e Jayasinghe, Miles, Bayley (2006).

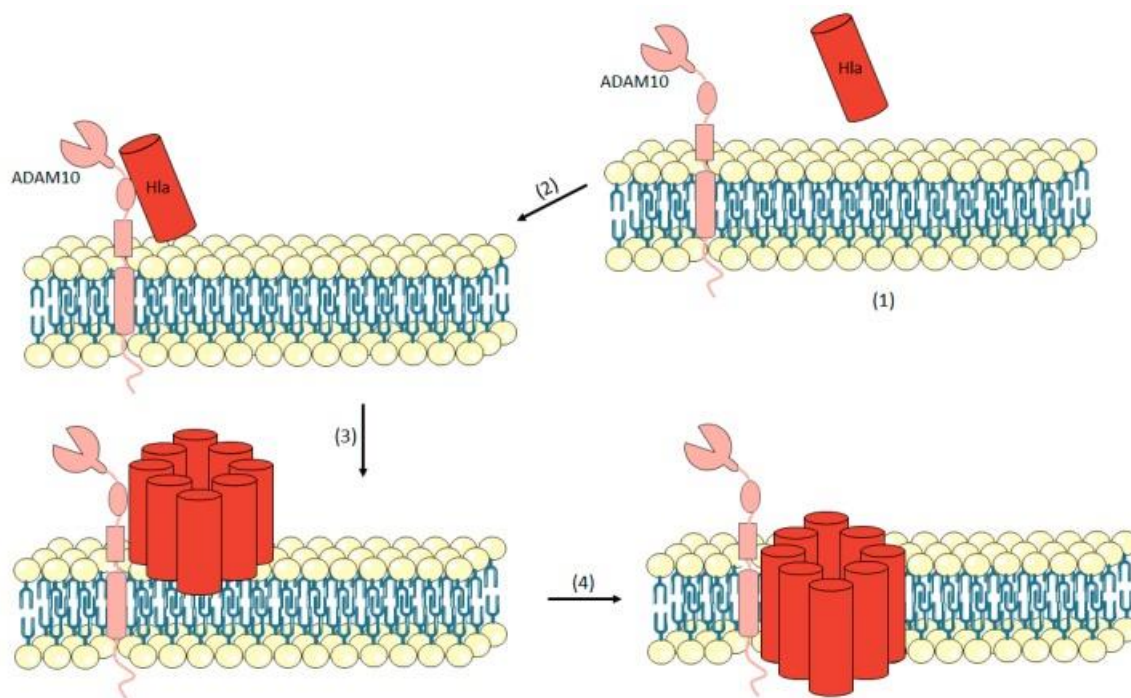
O poro formado pela oligomerização de sete protômeros de α -HL na membrana celular age como um canal iônico não seletivo (BHAKDI; TRANUM-JENSEN, 1991; RASHIDIEH *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2016). Aproximadamente 68% de sua estrutura é composta por folhas-beta e sua estrutura interior é hidrofílica, enquanto o exterior possui um anel hidrofóbico (SONG *et al.*, 1996). Além disso, possui três regiões, nomeadas de copal (*cap*) com 4,6 nm de diâmetro, anelar (*rim*) com 1,4 nm de diâmetro e troncular (*stem*) com 2 nm de diâmetro (Figura 1C). A região copal fica acoplada à superfície extramembranar, enquanto a região anelar e troncular estão inseridas na membrana celular, formando um canal transmembranar responsável pela passagem de moléculas e íons (MERZLYAK *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2015).

O mecanismo de ação da α -HL inclui o receptor ADAM10 (Figura 2), uma metaloprotease com variadas funções, incluindo as de interação entre diferentes células, células-matriz e clivagens de proteínas do meio extracelular. O receptor ADAM10 é expresso na superfície da maioria das células hospedeiras (SEALS; COURTNEIDGE, 2003; EDWARDS; HANDSLEY; PENNINGTON, 2008) e, após ligar-se a esse receptor, a α -HL passa pelo processo de oligomerização formando um pré-poro e, ao final, um poro proteico heptâmero transmembranar (SEILIE; WARDENBURG, 2017).

O estabelecimento do poro na membrana celular permite a saída de moléculas importantes como o ATP, causa o efluxo de íons K^+ e o influxo de íons Ca^{2+} (CASSIDY; HARSHMAN, 1976; BHAKD *et al.*, 1989; LIZAK; YAROVINSKY, 2012; BERUBE; WARDENBURG, 2013). A desregulação osmótica do meio intracelular com o excesso de Ca^{2+} estimula a hidrólise dos fosfolipídios da membrana, resultando na lise celular. Além disso, a toxina também está envolvida com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) e a ativação da via do inflamassoma NLRP3, associadas a intensos processos de inflamação, podendo causar até mesmo a necrose tecidual (GRIMMINGER *et al.*, 1997; SUTTORP *et al.*, 1985; ROSE *et al.*, 2002).

A expressão da α -HL é considerada de alta virulência (BERUBE; WARDENBURG, 2013; DELEO *et al.*, 2011), promovendo a formação de canais iônicos e, consequentemente, lise em hemácias, monócitos, linfócitos e células endoteliais, tornando as novas estratégias de tratamento urgentes (RASHIDIEH *et al.*, 2015).

Figura 2. Esquema do processo de oligomerização da alfa-hemolisina. 1) O protômero da α -HL se liga ao receptor ADAM10 da célula hospedeira. 2) Há o aumento na concentração de íons Ca^{2+} e queda rápida na concentração de íons K^+ . 3) Ocorre a ativação do inflamassoma NLRP3. 4) Ativação da caspase-1 que leva à lise celular.



Fonte: Retirado de Oliveira, Borges, Simões (2018).

2.3 Compostos derivados de tiazolidina e rodanina

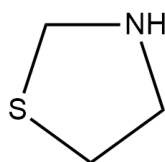
Apesar de haver opções variadas de antibióticos disponíveis para tratar as infecções, o surgimento de cepas multirresistentes associado aos fatores de virulência ameaçam, cada vez mais, a eficácia dos medicamentos disponíveis (ABUSETTA *et al.*, 2020). Assim, torna-se urgente a necessidade de novos compostos antibacterianos com mecanismos de ação que diferem dos atuais agentes antimicrobianos, como por exemplo na busca por bloqueadores da α -HL, um dos principais fatores de virulência de *S. aureus* (RASHIDIEH *et al.*, 2015).

Os compostos heterocíclicos são amplamente utilizados na química medicinal e desempenham um papel importante na busca de novas moléculas bioativas na indústria farmacêutica. Especialmente os heterocíclicos contendo nitrogênio parecem possuir uma gama diversificada de atividades biológicas, uma vez que são encontrados em muitas moléculas

naturais e sintéticas com atividades biológicas conhecidas (ABUSETTA *et al.*, 2020), incluindo propriedades bactericidas (TEJCHMAN *et al.*, 2019).

Com base nisso, os compostos tiazolidínicos merecem destaque, pois são compostos heterocíclicos que apresentam a fórmula química C_3H_7NS , recebendo destaque os heteroátomos de enxofre na posição 1 e o nitrogênio na posição 3 (Figura 3). Dentre as atividades biológicas, pode-se citar a ação antimicrobiana, tanto em bactérias gram-positivas como *S. aureus*, incluindo as cepas multirresistentes (TOMASIC *et al.*, 2010; DESAI *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2020) quanto em bactérias gram-negativas (ABUSETTA *et al.*, 2020).

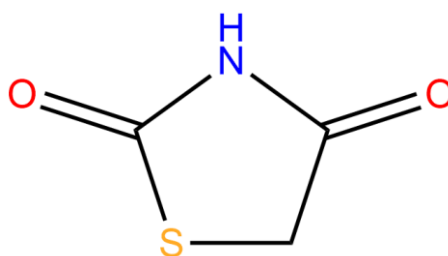
Figura 3. Estrutura da tiazolidina.



Fonte: Chemdraw; Autora (2022).

Alguns derivados merecem destaque, como por exemplo a tiazolidina-2,4-diona, que possui um grupo carbonil na posição 2 e 4 (Figura 4). Segundo Aziz *et al.* (2022) a adição da tiazolidina-2,4-diona na ciprofloxacina auxiliou no mecanismo de bloqueio da síntese de DNA de *S.aureus*, demonstrando a capacidade de inibição da topoisomerase IV e girase. Além disso, segundo o estudo de Vasconcelos *et al.* (2022), a presença do derivado também auxiliou no efeito antitumoral, revertendo alterações metabólicas causadas pelo glioblastoma. Ainda segundo Vasconcelos *et al.* (2022), a presença das duas carbonilas do derivado permite diversas atividades biológicas, como a anticancerígena, anti-inflamatória, antidiabética, antimicrobiana, antiviral, antioxidante e neuroprotetora (BARROS *et al.*, 2010; ALBERS *et al.*, 2014; MUGHAL *et al.*, 2015; NAIM *et al.*, 2017; BANSAL *et al.*, 2020).

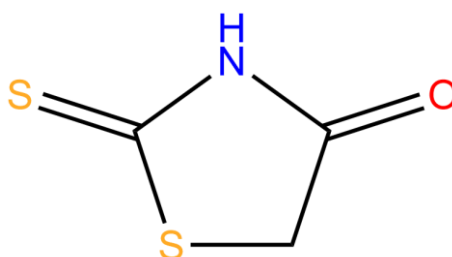
Figura 4. Estrutura da tiazolidina-2,4-diona.



Fonte: Chemdraw; Autora (2022).

Outro núcleo farmacofórico de interesse é a rodanina (TEJCHMAN *et al.*, 2019). Trata-se de um composto orgânico heterocíclico de 5 membros que possui um núcleo de tiazolidina. A estrutura é similar à da tiazolidina-2,4-diona, no entanto, possui um grupo tiocarbonil no lugar da carbonila na posição 2 (Figura 5). A presença desses átomos de dupla ligação com outros grupos funcionais resulta em uma densidade particularmente alta de sítios de ligação para interações polares e ligações de hidrogênio, que são responsáveis por sua ampla gama de propriedades biológicas, como a antibacteriana (MOELLERING, 2008), antifúngica (LIU *et al.*, 2014), antidiabética (SCHEMMEL; PADIYARA; D'SOUZA, 2010), anti-inflamatória (CUTSHALL; O'DAY; PREZHDO, 2005), antituberculose (ALEGAON *et al.*, 2012), antitumoral (OMAR *et al.*, 2010), anti-HIV (RAJAMAKI *et al.*, 2009), antiparasitária (KUMAR *et al.*, 2007), hipnótica (ERGENÇ *et al.*, 1999) e anti-helmíntica (RAUTER *et al.*, 2005). Além disso, tem demonstrado, também, ação contra cepas SARM e SARV de *S. aureus* tanto em condições *in vitro* quanto *in vivo* (ABDELKHALEK *et al.*, 2016).

Figura 5. Estrutura da rodanina.



Fonte: Chemdraw; Autora (2022).

Dessa forma, os derivados tiazolidínicos e rodanínicos apresentam-se como estruturas com potencial de ação bloqueadora do canal da α -HL, diminuindo a atividade desse fator de virulência responsável pela desregulação e morte celular do hospedeiro. O bloqueio farmacológico da α -HL poderia, então, ser um auxiliar terapêutico, diminuindo a atividade desse fator de virulência que contribui diretamente com o crescimento bacteriano, morte celular e intensas respostas imunológicas.

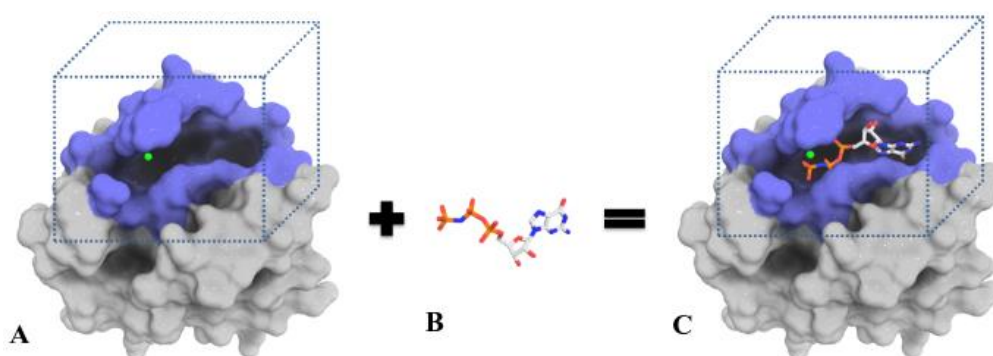
2.4 Aplicação do *docking* molecular na farmacologia

Os avanços tecnológicos permitiram o surgimento de abordagens computacionais de grande importância em pesquisas científicas no campo da farmacologia. Através desses procedimentos, há uma redução da quantidade de compostos químicos a serem testados

experimentalmente, permitindo que os estudos experimentais concentrem-se em alvos mais precisos importantes na triagem de novas moléculas (FEINSTEIN e BRYLINSKI, 2015). Um tipo importante de ferramenta computacional é a de *docking* molecular, pois permite aplicações terapêuticas no design moderno de drogas (HUANG; ZOU, 2010). Trata-se de um estudo *in silico* dos complexos moleculares formados entre um ligante e uma região específica do receptor de interesse, com objetivo de entender as principais interações e afinidades envolvidas nesse complexo (HUANG; ZOU, 2010) (Figura 6).

Da síntese à comercialização de medicamentos, são necessários de 10 a 20 anos. Além disso, é considerado um processo custoso, podendo chegar a 800 milhões de dólares (VERLI, 2014). Por esse motivo, a ferramenta também pode reduzir tempo e custos financeiros. Através do *docking* molecular, é possível testar variados tipos de fármacos em proteínas de interesse antes de realizar testes experimentais, economizando tempo, dinheiro em pesquisas e otimizando etapas (PINZI; RASTELLI, 2019). Além de formar complexos entre receptores e ligantes, a técnica também é útil em estudos de interação entre diferentes proteínas e entre proteínas e ácidos nucleicos (ZACHARIAS, 2010; VERLI, 2014).

Figura 6. Esquematização do processo de *docking* ou atracamento molecular. A) Proteína alvo. B) Ligante. C) Complexo receptor-ligante.



Fonte: Adaptado de Verli (2014) e DockThor.

Inicialmente, o *docking* foi baseado no modelo chave-fechadura proposto por Emil Fischer em 1884, em que o ligante corresponde a chave e o receptor a fechadura. Hoje sabe-se que a técnica utiliza tanto estruturas rígidas quanto flexíveis. A flexibilidade diz respeito às características relacionadas às orientações das moléculas. Há diferentes formas de se estudar o

complexo receptor-ligante, podendo ser estudado com a proteína rígida e o ligante flexível ou ambos flexíveis (VERLI, 2014).

Na formação do complexo receptor-ligante, alguns fatores são levados em consideração, como por exemplo os graus de liberdade, onde são investigadas as diferentes conformações do ligante no sítio de ligação do receptor. Esses graus de liberdade podem ser tanto translacionais e rotacionais, considerando a movimentação da molécula no receptor quanto os conformacionais, que levam em consideração os diedros ou ligações químicas simples dos ligantes (VERLI, 2014). Um outro fator levado em consideração é o grau de afinidade, que consiste nas interações intermoleculares envolvendo o receptor e o ligante (VERLI, 2014; FEINSTEIN e BRYLINSKI, 2015).

Para investigar as forças intra e intermoleculares na formação do complexo receptor-ligante, há a função de avaliação, que utiliza cálculos de campo de força da mecânica molecular, como por exemplo o conhecido *Merck Molecular Force Field 94* (MMFF94). O MMFF94 calcula uma soma de fatores, como as ligações (*bond stretching*), ângulo das ligações (*angle bending*), energia do termo cruzado (*stretch-bend*), torção diedral própria (*out-of-plane bending*), torção diedral imprópria (*torsion interactions*), interações de van der Waals (*van der waals interactions*) e eletrostáticas (*electrostatic interactions*) (ALMEIDA, 2011). Além do MMFF94, pode-se citar, também, o CHARMM (WU *et al.*, 2003), GROMACS (STJERNSCHANTZ e OOSTENBRINK, 2010) e potenciais baseados em conhecimento, como o DrugScore (VELEC; GOHLKE; KLEBE, 2005) e o DSX (NEUDERT e KLEBE, 2011).

Além da função de avaliação, há também o algoritmo de busca, que visa solucionar as melhores conformações do ligante. Como exemplo, pode-se citar os algoritmos do tipo estocásticos, que realizam mudanças nos graus de liberdade. Dentre deste grupo, pode-se citar os métodos de Monte Carlo (MC) e algoritmos evolucionistas. No MC são feitas mudanças aleatórias para alterar a translação e rotação do ligante, bem como os ângulos de torção. Após cada movimento, a estrutura é minimizada e a energia da nova estrutura é determinada. Os algoritmos evolucionistas são semelhantes aos métodos MC, no entanto, são usados para encontrar o mínimo global de energia e são baseados na teoria da evolução de Charles Darwin. As moléculas representam “indivíduos”, e os mais aptos são transportados para a próxima geração. Além disso, mutações aleatórias podem ser feitas para aumentar a diversidade genética. Um tipo de algoritmo evolucionista importante é o genético. Algoritmos genéticos consideram mais alguns fatores, como a troca de genes dos parentais, o tamanho da população, as taxas de mutação, taxas de cruzamento e número de rodadas evolutivas (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003; VERLI, 2014).

Por fim, há uma função de pontuação, onde são realizados cálculos que irão ranquear os complexos formados. Esses cálculos buscam a solução mais estável, baseando-se nos princípios termodinâmicos de mínimo de energia global ou energia livre de ligação de Gibbs (VERLI, 2014; PINZI; RASTELLI, 2019), associada a constante de equilíbrio de ligação K_{eq} :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_{eq}$$

onde ΔH é a variação de entalpia, T é a temperatura absoluta, ΔS é a variação de entropia, R é a constante universal dos gases e K_{eq} é a constante de equilíbrio de ligação (VERLI, 2014).

As etapas para a realização do *docking* molecular levam em consideração, a princípio, a preparação dos ligantes, que podem ser obtidos em bancos de dados ou serem modelados. Além disso, é necessário realizar a minimização de energia a fim de deixar a molécula em sua conformação mais estável, ou seja, mais próxima do experimental. Outro passo é preparar o receptor de interesse, que pode ser encontrado principalmente nos bancos de dados. A preparação pode incluir, por exemplo, a remoção de ligantes presentes na cristalografia e um estudo completo da proteína para eleger os melhores sítios de ligação (STANZIONE; GIANGRECO; COLE, 2021).

Após definidos os parâmetros, é possível realizar a submissão das moléculas, que são analisadas pela função de avaliação e pontuação (*scoring*), fazendo com que o ligante seja ranqueado e receba pontuações de acordo com a variação dos graus de liberdade previamente descritos, que buscam quantificar as soluções obtidas no atracamento molecular (PINZI; RASTELLI, 2019). Essas avaliações levam em consideração o algoritmo utilizado pelo programa de *docking* molecular (KITCHEN *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar por meio do *docking* molecular o potencial efeito bloqueador dos derivados de rodanina e derivados da tiazolidina frente ao canal iônico formado pela alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar as melhores poses dos derivados da rodanina (LPSF/AG-55, LPSF/AG-58 e LPSF/AG-104) na formação do complexo com o canal iônico da alfa-hemolisina;
- Investigar as melhores poses dos derivados diretos da tiazolidina (LPSF/GQ-294, LPSF/GQ-310 e LPSF/GQ-443) na formação do complexo com o canal iônico da alfa-hemolisina;
- Realizar a predição da afinidade entre os diferentes candidatos a fármacos e o canal iônico da alfa-hemolisina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

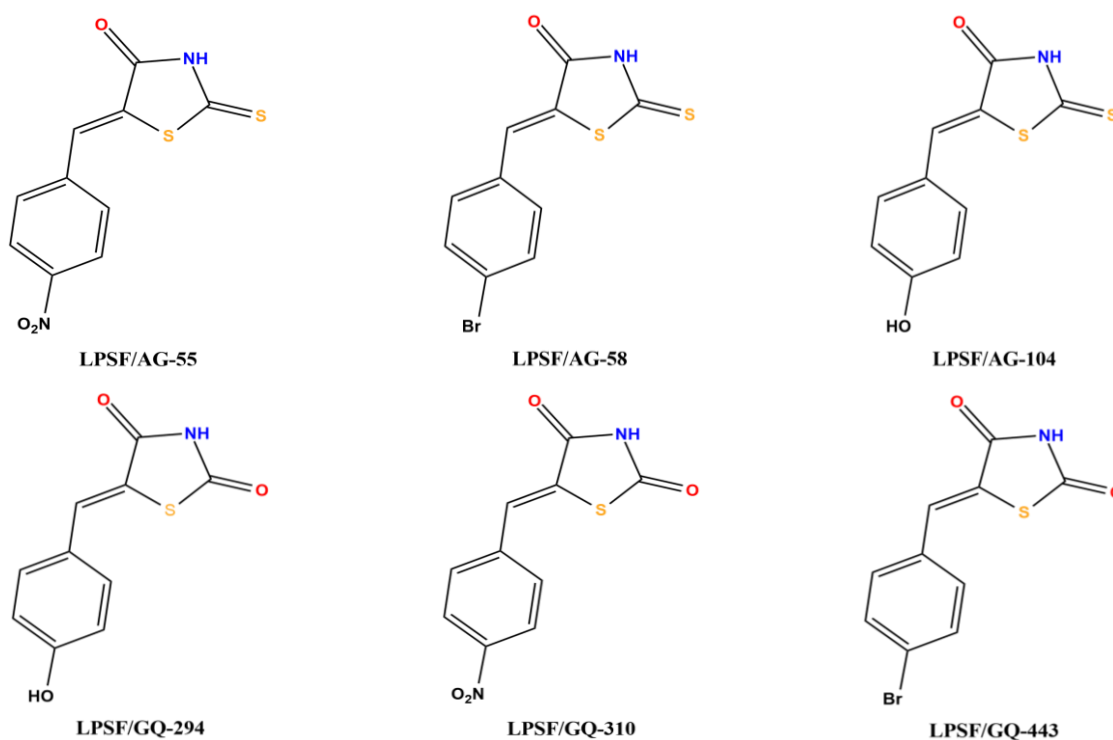
4.1 Obtenção dos candidatos a fármacos

O planejamento dos fármacos ocorreu no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica, Suely Galdino (NUPIT-SG) da Universidade Federal de Pernambuco. As estruturas e fórmulas químicas foram cedidas em parceria com o Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco - Dr. Oleg Krasilnikov (LBM-CT) com o propósito de testar esses candidatos a fármacos como potenciais bloqueadores do canal iônico formado pela α -HL de *S. aureus*.

A seleção das moléculas se deu por aquelas que apresentam 1) custo de síntese mais acessível; 2) boa atividade antimicrobiana, com foco especial em cepas de *S. aureus*; 3) tamanho menor que o diâmetro da região copal do canal, para uma maior probabilidade de interação entre a molécula e o canal iônico e com hidrogênios lábeis que facilitem interações fortes como as de hidrogênio.

Ao total, foram selecionados e disponibilizados seis candidatos a fármacos, sendo três derivados de rodanina, denominados de LPSF/AG-55, LPSF/AG-58 e LPSF/AG-104 e três derivados diretos da tiazolidina, denominados LPSF/GQ-294, LPSF/GQ-310 e LPSF/GQ-443 (Figura 7).

Figura 7. Candidatos a fármacos selecionados para o ensaio *in silico* com o canal iônico da alfa-hemolisina.



Fonte: Chemdraw; Autora (2022).

4.2 Simulação computacional

4.2.1 Desenho dos compostos tiazolidínicos

Os compostos tiazolidínicos foram desenhados em estruturas tridimensionais no *software* Avogadro, onde também foi realizada uma pré-otimização de energia com o campo de força MMFF94, considerado padrão para as otimizações de energia. A otimização é uma etapa importante, pois é necessário que os ligantes também possuam a menor energia livre possível entre os seus átomos, ou seja, uma conformação mais estável e próxima do que seria em estudos experimentais.

4.2.2 Otimização de energia dos compostos tiazolidínicos

Após convertidos em estruturas tridimensionais, os compostos modelados passaram por uma otimização de energia mais robusta através do *software* GAMESS. A partir do Avogadro foi gerado um *input* com os parâmetros utilizando o método *Ab initio* - DFT-B3LYP - Base: 6-31G +d, p; charge: 0; Spin: singlet. Após isso, o *input* foi gerado no GAMESS, onde obteve-se também o *output* com a estrutura otimizada.

4.2.3 Obtenção e tratamento da estrutura cristalográfica do canal iônico da alfa-hemolisina

A estrutura cristalográfica do poro proteico da α -HL foi obtida no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) com o código 7AHL (SONG *et al.*, 1996). O cristal do poro da alfa-hemolisina foi obtido pelo método de difração de raios-X, é bem elucidado e apresenta uma resolução de 1.89 Å. O tratamento da toxina foi realizado no *software* Discovery Studio Visualizer, com a remoção das moléculas de água presentes na cristalografia, pois poderiam influenciar na formação do complexo de docking.

4.2.4 Definição dos sítios de ligação no canal da alfa-hemolisina

Um ligante pode variar sua orientação dentro do sítio de ligação do receptor através dos chamados graus de liberdade translacionais, rotacionais e conformacionais como citado anteriormente. Para isso, é preciso saber quais as regiões da proteína são consideradas mais sensíveis a ligantes. Com base nas três regiões da proteína (Figura 8), foram calculadas as coordenadas atômicas de resíduos centrais em cada região. Além disso, o centro da caixa ou

grid center foi ajustado de modo a incluir os sítios de ligação selecionados, que correspondem ao lúmen do canal (Tabela 1).

Figura 8. Definição do *grid center* através do *software* VMD. A) Vista lateral; B) Vista superior; C) Vista inferior. Em laranja: resíduos do aminoácido Serina (SER 3) na região copal. Em rosa: resíduos do aminoácido lisina (LYS 147) na região anelar. Em verde: resíduos do aminoácido glicina (GLY 137) na região troncular.

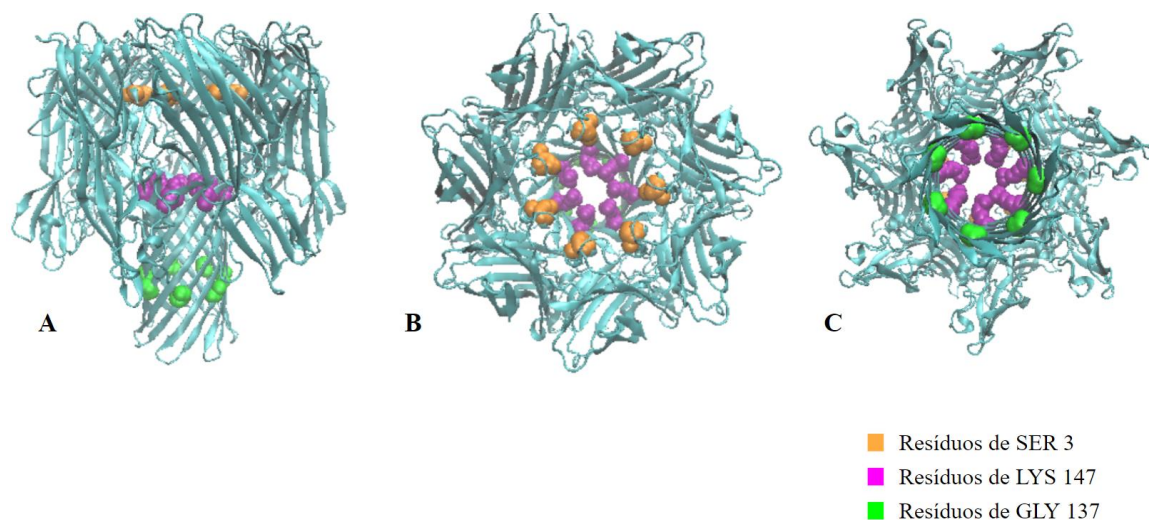


Tabela 1. Coordenadas atômicas X, Y e Z dos resíduos selecionados para o *grid center* das três regiões do canal estabelecidas para este estudo (copal, anelar e troncular).

Região do canal	Resíduo selecionado para o <i>grid center</i>	Coordenadas		
		X	Y	Z
Copal	Serina (SER 3)	61,265	32,821	54,049
Anelar	Lisina (LYS 147)	39,188	32,857	31,429
Troncular	Glicina (GLY 137)	19,407	32,851	13,438

Fonte: Autora (2022).

4.2.5 Docking molecular

O atracamento molecular foi realizado pelo *software* DockThor (MAGALHÃES *et al.*, 2014), que foi desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC). A plataforma é disponível gratuitamente e seus cálculos são realizados pelo supercomputador Santos Dumont, suportando experimentos de triagem virtual com até 200 compostos para usuários convidados e 5.000 compostos para projetos cadastrados (GUEDES *et al.*, 2021).

O DockThor considera o receptor na forma rígida e o ligante na forma flexível, utiliza o campo de força da mecânica molecular MMFF94 como fonte de avaliação e é baseado no algoritmo genético, utilizando-o como fonte de busca (ALMEIDA, 2011). As moléculas deste trabalho foram submetidas ao *docking*, na plataforma DockThor, com os parâmetros indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Configurações da caixa para a realização do *docking* nas regiões copal, anelar e troncular.

Parâmetros	Região copal	Região anelar	Região troncular
Tamanho da caixa	30 Å	20 Å	20 Å
Discretização da caixa	0,42 Å	0,25 Å	0,25 Å
Total de pontos da caixa	373248	531441	531441

Fonte: Autora (2022).

As moléculas foram submetidas ao DockThor, sendo adicionados os hidrogênios nos ligantes, que correspondem à correção dos estágios de protonação. Foram avaliados diferentes tamanhos de caixa, no entanto, foi selecionado o tamanho padrão de 20 Å para a região anelar e troncular. Para a região copal, que possui o maior diâmetro, a caixa foi ajustada para 30 Å. As coordenadas X, Y e Z foram definidas de acordo com cada região do canal (Tabela 1), sendo realizado o total de três *dockings* por ligante, correspondentes a região copal, região anelar e troncular (Figura 9).

Os parâmetros utilizados no algoritmo são considerados padrão da plataforma (Tabela 3). Além disso, foi habilitada a opção *soft docking*, que considera uma ligeira flexibilidade da proteína por meio da suavização do potencial MMFF94 e uma constante de “amolecimento” determinada empiricamente.

Tabela 3. Configurações do algoritmo utilizado no DockThor.

Configurações do algoritmo	
Tamanho da população	750
Número de avaliações (AG)	1.000.000
Número de execuções	24

Fonte: Autora (2022).

4.2.6 Análise dos resultados

A visualização dos complexos receptor-ligante foi realizada através do software Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, 2021), onde também foram geradas as imagens destacando as interações químicas entre o complexo receptor-ligante e, também, foi utilizado o software VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), onde foram geradas as imagens de posicionamento do ligante na α -HL.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados do *docking* molecular (rodanina)

5.1.1 LPSF/AG-55

Nas tabelas 4 e 5 encontram-se, respectivamente, os resultados das energias de interação e das interações intermoleculares da região anelar, que corresponde a região de menor ΔG (- 7.129 kcal/mol) obtidos no *docking* realizado entre o canal da alfa-hemolisina e a molécula AG-55. Na figura 9 encontram-se os diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares estabelecidas pela AG-55 na região anelar do poro da α -HL.

Tabela 4. Resumo das energias de interação do ligante AG-55 e o canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Pose	Energia total (kcal/mol)	Energia interna	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
<i>Copal</i>	Run 19	-4.297	-25.137	-14.033	-11.104	-6.205
<i>Anelar</i>	Run 17	-0.939	-22.101	-13.205	-8.826	-7.129
<i>Troncular</i>	Run 16	0.429	-20.447	-14.925	-5.522	-6.958

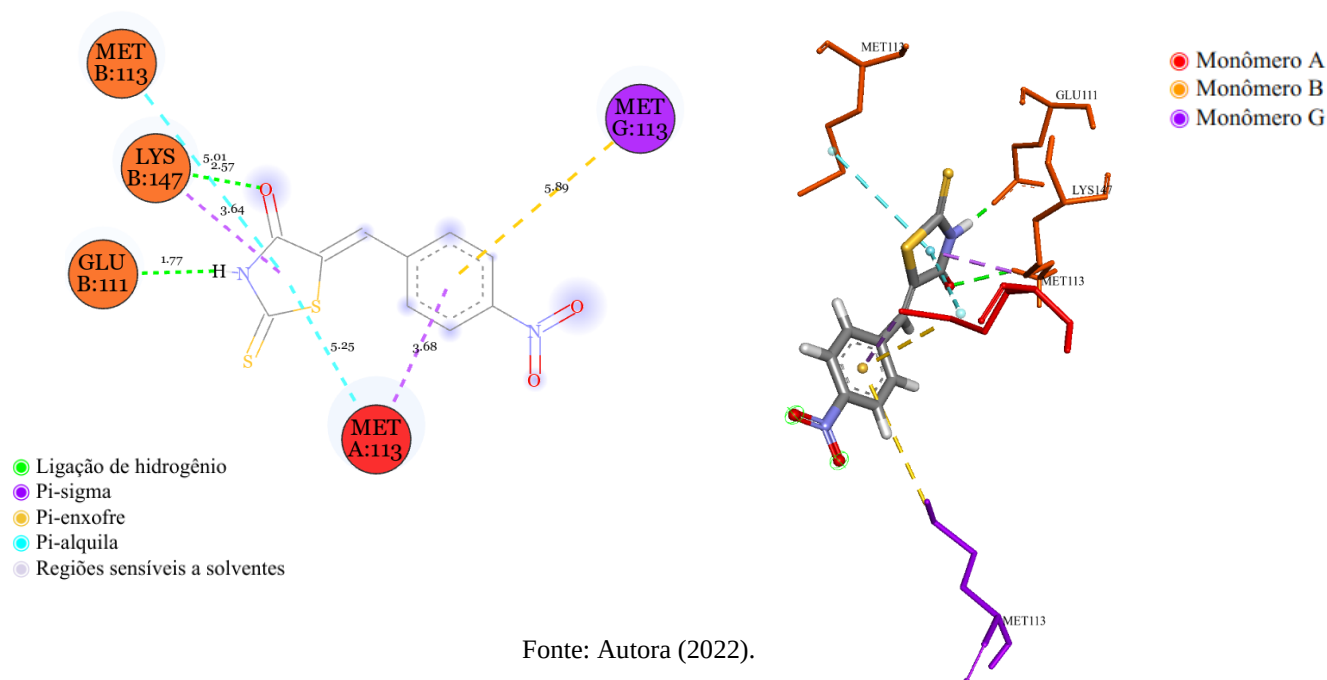
Fonte: Autora (2022).

Tabela 5. Resumo das interações químicas do ligante AG-55 e a região anelar da alfa-hemolisina.

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
<i>Anelar</i>	Ligação de H	2	1.77	Glutamato (B111)
			2.57	Lisina (B147)
	Pi-sigma	2	3.64	Lisina (B147)
			3.68	Metionina (A113)
	Pi-enxofre	2	4.00	Metionina (A113)
			5.89	Metionina (G113)
	Pi-alquila	2	5.25	Metionina (A113)
			5.01	Metionina (B113)

Fonte: Autora (2022).

Figura 9. Diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares envolvidas entre a AG-55 e resíduos da região anelar do poro da alfa-hemolisina.



5.1.2 LPSF/AG-58

Os resultados das energias de interação (Tabela 6) e das interações intermoleculares da região troncular ($\Delta G = -6.859$ kcal/mol) (Tabela 7) obtidos no *docking* realizado entre o canal da alfa-hemolisina e a molécula AG-58 estão a seguir. Na figura 10 encontram-se os diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares estabelecidas pela AG-58 na região troncular do poro da α -HL.

Tabela 6. Resumo das energias de interação do ligante AG-58 e o canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Pose	Energia total (kcal/mol)	Energia interna	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
<i>Copal</i>	Run 20	-17.518	-25.256	-14.743	-10.513	-6.436
<i>Anelar</i>	Run 20	-14.084	-21.663	-3.908	-17.755	-6.705
<i>Troncular</i>	Run 01	-10.813	-18.438	-10.433	-8.005	-6.859

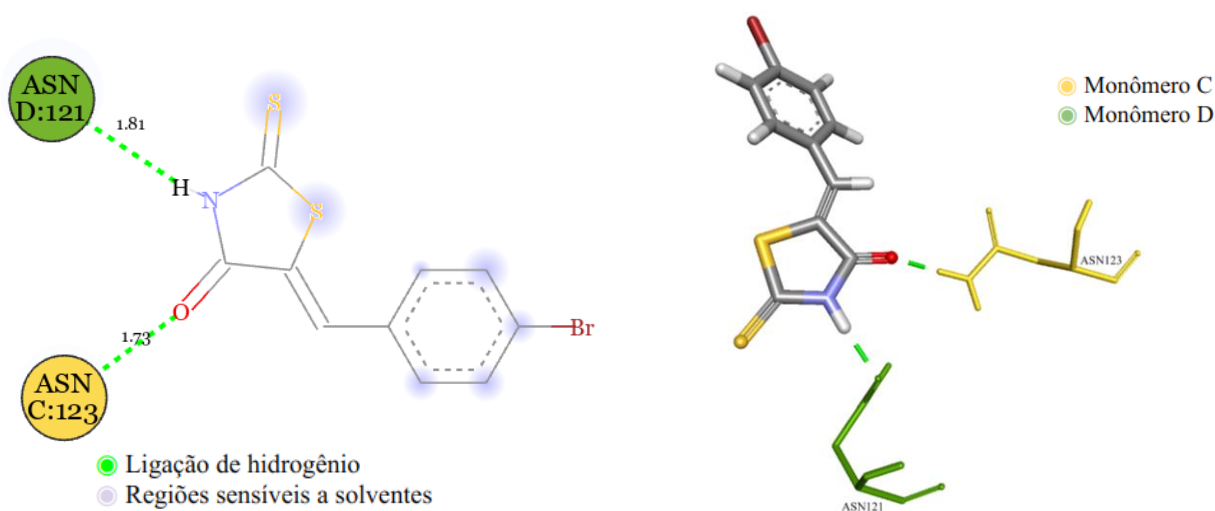
Fonte: Autora (2022).

Tabela 7. Resumo das interações químicas do ligante AG-58 e a região troncular da alfa-hemolisina.

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
Troncular	Ligação de H	2	1.73	Asparagina (C123)
			1.81	Asparagina (D121)

Fonte: Autora (2022).

Figura 10. Diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares envolvidas entre a AG-58 e resíduos da região troncular do poro da alfa-hemolisina.



Fonte: Autora (2022).

5.1.3 LPSF/AG-104

Nas tabelas 8 e 9 encontram-se, respectivamente, os resultados das energias de interação e das interações intermoleculares da região troncular ($\Delta G = -6.928$ kcal/mol) obtidos no *docking* realizado entre o canal da alfa-hemolisina e a molécula AG-104. Na figura 11 encontram-se os diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares estabelecidas pela AG-104 na região troncular do poro da α -HL.

Tabela 8. Resumo das energias de interação do ligante AG-104 e o canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Pose	Energia total (kcal/mol)	Energia interna	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
<i>Copal</i>	Run 19	-20.107	-24.725	-13.743	-10.982	-6.341
<i>Anelar</i>	Run 08	-18.370	-22.761	-7.735	-15.026	-6.928
<i>Troncular</i>	Run 19	-15.977	-21.030	-9.572	-11.458	-6.957

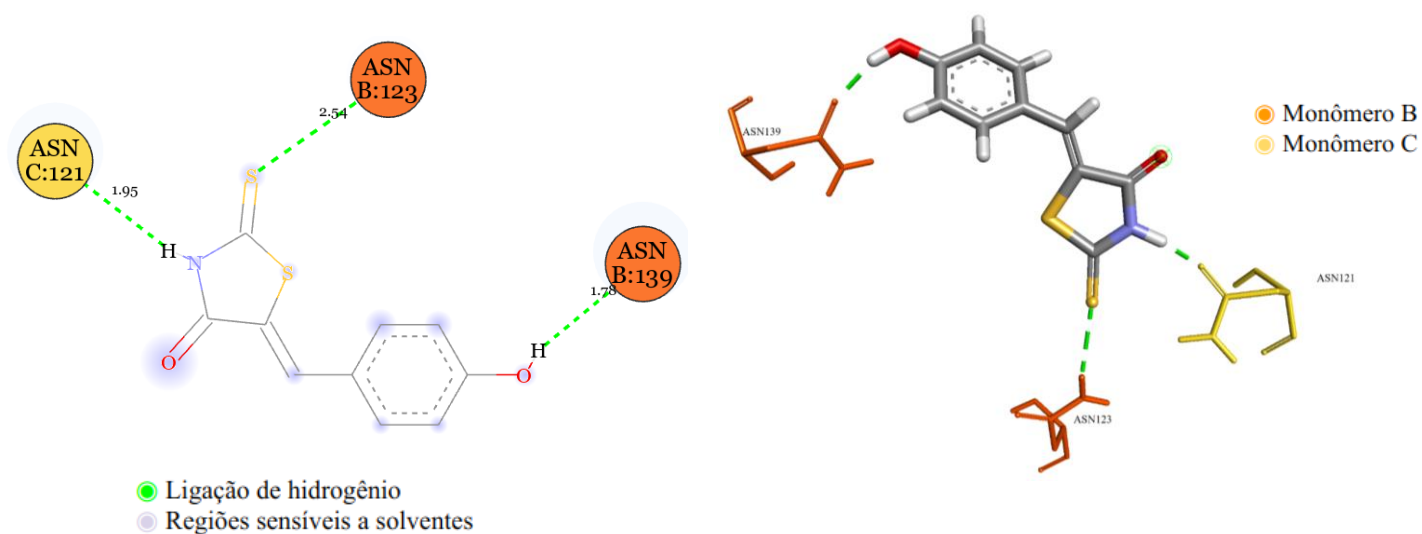
Fonte: Autora (2022).

Tabela 9. Resumo das interações químicas do ligante AG-104 e a região troncular da alfa-hemolisina.

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
<i>Troncular</i>	Ligação de H	3	2.54	Asparagina (B123)
			1.78	Asparagina (B139)
			1.95	Asparagina (C121)

Fonte: Autora (2022).

Figura 11. Diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares envolvidas entre a AG-104 e resíduos da região troncular do poro da alfa-hemolisina.



Fonte: Autora (2022).

5.2 Resultados do *docking* molecular (tiazolidina)

5.2.1 LPSF/GQ-294

Os resultados das energias de interação (Tabela 10) e das interações intermoleculares da região troncular ($\Delta G = -6.923$ kcal/mol) (Tabela 11) obtidos no *docking* realizado entre o canal da alfa-hemolisina e a molécula GQ-294 estão a seguir. Na figura 12 encontram-se os diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares estabelecidas pela molécula GQ-294 na região troncular do poro da α -HL.

Tabela 10. Resumo das energias de interação do ligante GQ-294 e o canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Pose	Energia total (kcal/mol)	Energia interna	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
<i>Copal</i>	Run 22	-25.686	-27.410	-10.427	-16.983	-6.444
<i>Anelar</i>	Run 01	-22.436	-22.933	0.434	-23.367	-6.152
<i>Troncular</i>	Run 12	-20.257	-20.810	-10.361	-10.449	-6.923

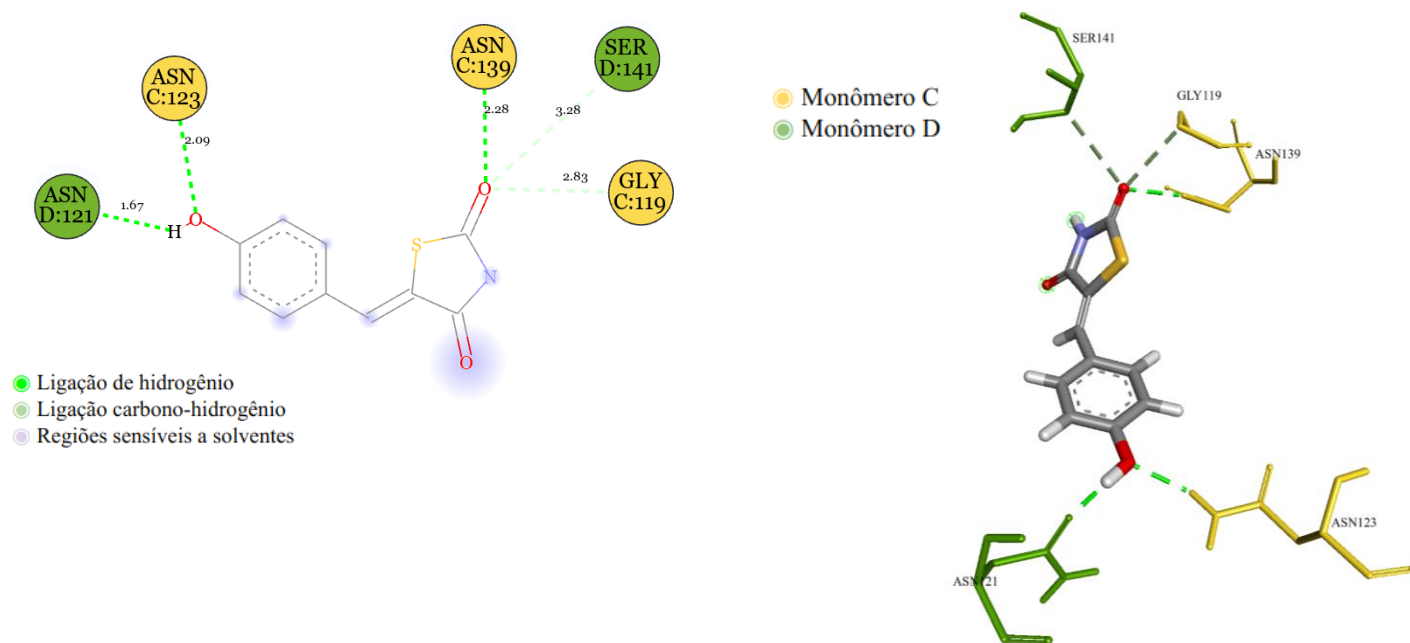
Fonte: Autora (2022).

Tabela 11. Resumo das interações químicas do ligante GQ-294 e a região troncular do poro da alfa-hemolisina.

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
<i>Troncular</i>	Ligação de H	3	2.09	Asparagina (C123)
			2.28	Asparagina (C139)
			1.67	Asparagina (D121)
	Ligação C-H	2	2.83	Glicina (C119)
			3.28	Serina (D141)

Fonte: Autora (2022).

Figura 12. Diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares envolvidas entre a GQ-294 e resíduos da região troncular do poro da alfa-hemolisina.



Fonte: Autora (2022).

5.2.2 LPSF/GQ-310

Os resultados das energias de interação e das interações intermoleculares da região troncular ($\Delta G = -6.743$ kcal/mol), obtidos no *docking* realizado entre o canal da alfa-hemolisina e a molécula GQ-310, encontram-se nas tabelas 12 e 13, respectivamente. Na figura 13 encontram-se os diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares estabelecidas pela molécula GQ-310 na região troncular do poro da α -HL.

Tabela 12. Resumo das energias de interação do ligante GQ-310 e o canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Pose	Energia total (kcal/mol)	Energia interna	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
<i>Copal</i>	Run 19	-6.730	-23.687	-11.937	-11.750	-5.988
<i>Anelar</i>	Run 14	-4.924	-21.883	1.408	-23.291	-6.001
<i>Troncular</i>	Run 24	-1.854	-18.798	-12.366	-6.432	-6.743

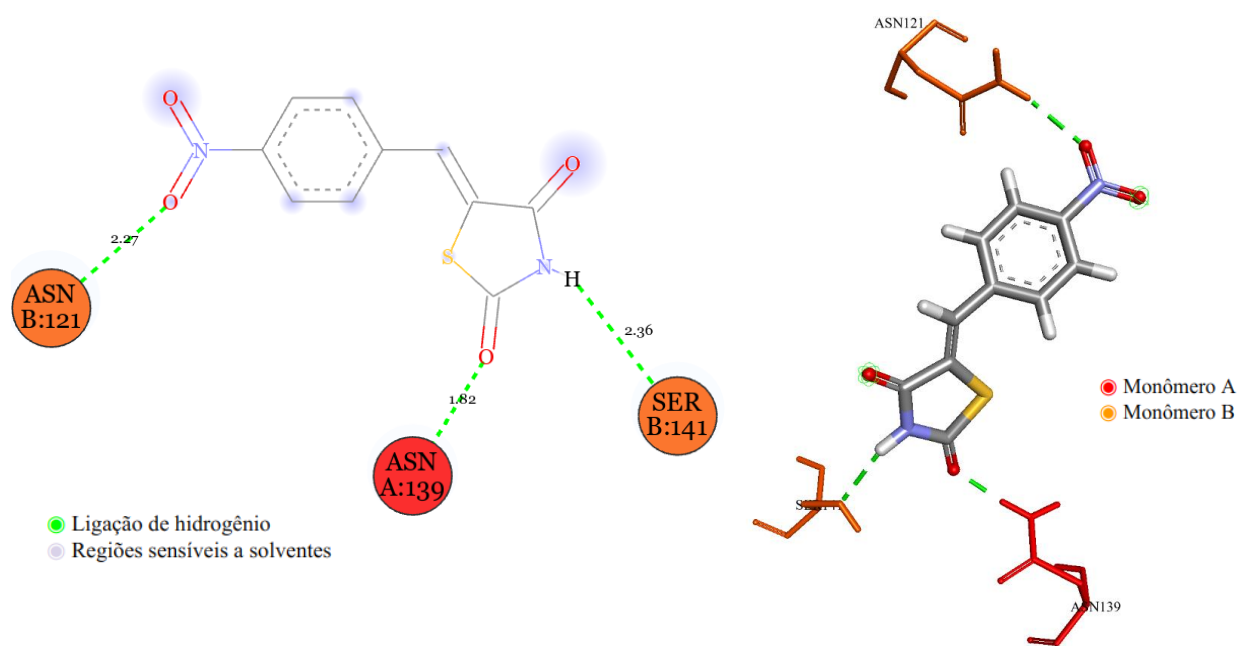
Fonte: Autora (2022).

Tabela 13. Resumo das interações químicas do ligante GQ-310 e a região troncular do canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
Troncular	Ligação de H	3	1.82	Asparagina (A139)
			2.27	Asparagina (B121)
			2.36	Serina (B141)

Fonte: Autora (2022).

Figura 13. Diagrama 2D e 3D das interações intermoleculares envolvidas entre a GQ-310 e resíduos da região troncular do poro da alfa-hemolisina.



Fonte: Autora (2022).

5.2.3 LPSF/GQ-443

Os resultados das energias de interação e das interações intermoleculares na região troncular ($\Delta G = -6.944$ kcal/mol), obtidos no *docking* realizado entre o canal da alfa-hemolisina e a molécula GQ-443, encontram-se nas tabelas 14 e 15, respectivamente. Na figura 14 encontram-se os diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares estabelecidas pela molécula GQ-443 na região troncular do poro da α -HL.

Tabela 14. Resumo das energias de interação do ligante GQ-443 e o canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Pose	Energia total (kcal/mol)	Energia interna	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
<i>Copal</i>	Run 24	-20.159	-24.671	-13.298	-11.373	-6.378
<i>Anelar</i>	Run 17	-18.473	-22.173	-10.923	-11.250	-6.906
<i>Troncular</i>	Run 20	-14.131	-17.763	-12.241	-5.522	-6.944

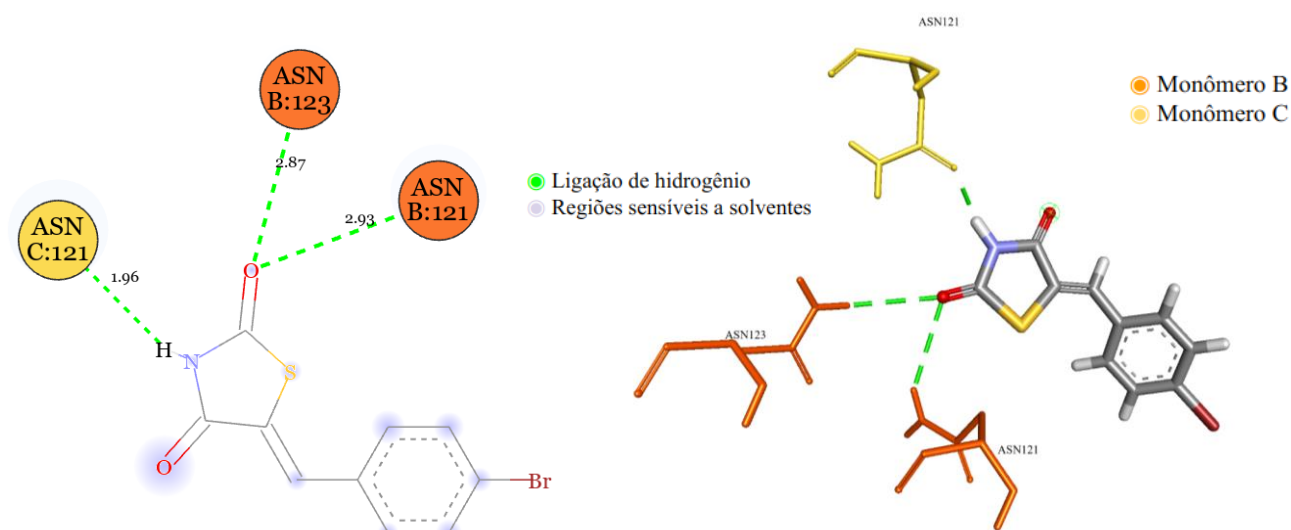
Fonte: Autora (2022).

Tabela 15. Resumo das interações químicas do ligante GQ-443 e a região anelar do canal iônico da alfa-hemolisina.

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
<i>Troncular</i>	Ligação de H	3	2.93	Asparagina (B121)
			2.87	Asparagina (B123)
			1.96	Asparagina (C121)

Fonte: Autora (2022).

Figura 14. Diagramas 2D e 3D das interações intermoleculares envolvidas entre a GQ-443 e resíduos da região troncular do poro da alfa-hemolisina.



Fonte: Autora (2022).

5.3 Resumo das interações obtidas no *docking* molecular

5.3.1 Resultado do ranqueamento dos melhores ligantes

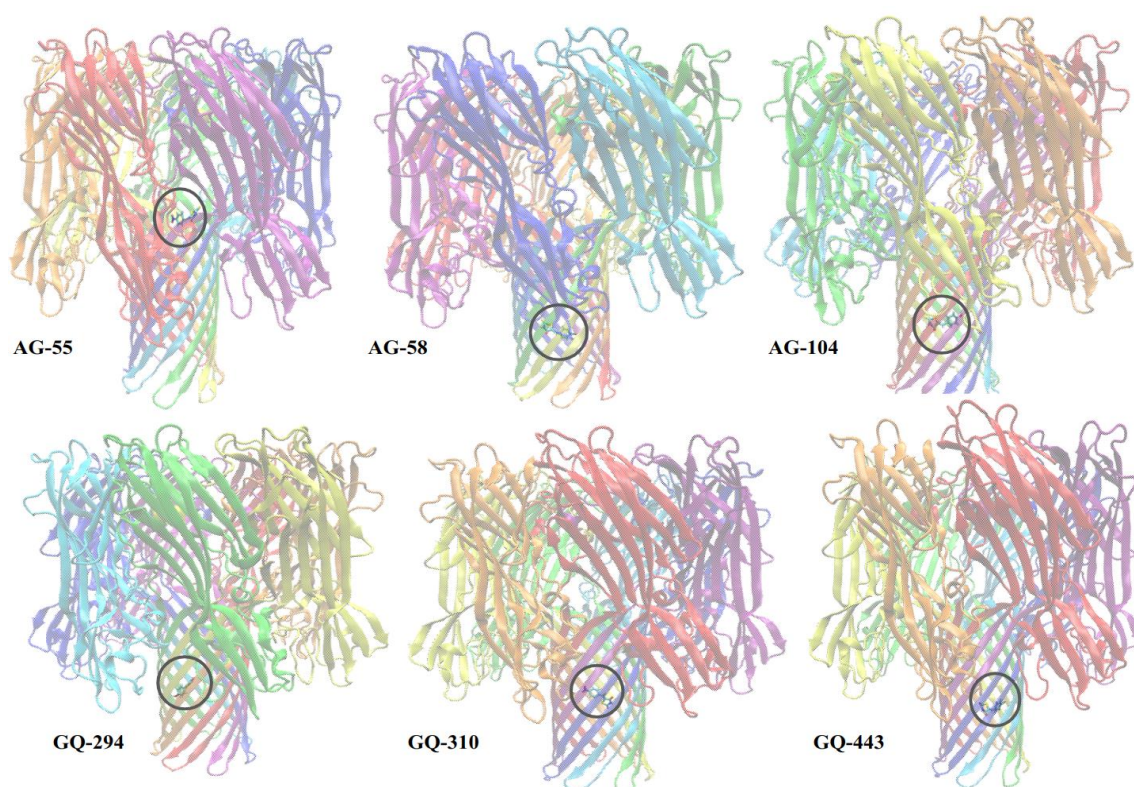
O ranqueamento com base no ΔG dado pelo parâmetro de afinidade entre o canal da alfa-hemolisina e os ligantes, encontra-se na tabela 16. Na figura 15 observa-se a localização de cada ligante no poro da α -HL.

Tabela 16. Ranqueamento dos ligantes de acordo com a predição do ΔG , dada pelo parâmetro de afinidade.

Ligante	Região	Pose	vdW	Coulomb	Afinidade (kcal/mol)
AG-55	Anelar	Run 17	-13.205	-8.826	-7.129
AG-104	Troncular	Run 19	-9.572	-11.458	-6.957
GQ-443	Troncular	Run 20	-12.241	-5.522	-6.944
GQ-294	Troncular	Run 12	-10.361	-10.449	-6.923
AG-58	Troncular	Run 01	-10.433	-8.005	-6.859
GQ-310	Troncular	Run 24	-12.366	-6.432	-6.743

Fonte: Autora (2022).

Figura 15. Ligantes no poro da alfa-hemolisina. Subunidades monoméricas: ● A ● B ● C ● D ● E
● F ● G.



Fonte: Autora (2022).

5.3.2 Resumo das interações dos ligantes com o poro da alfa-hemolisina

O resumo dos aminoácidos do poro da alfa-hemolisina que interagiram com os ligantes e o das regiões desses ligantes que possuíram maior destaque encontram-se nas tabelas 17 e 18 respectivamente.

Tabela 17. Resumo dos aminoácidos da alfa-hemolisina que interagiram com os melhores ligantes, selecionados de acordo com a predição do ΔG , dada pelo parâmetro de afinidade.

Aminoácidos	Subunidade + Posição	Quantidade de interações	Região
Glutamato	B111	1	Anelar
Lisina	B147	2	Anelar
Metionina	A113, B113, G113	4	Anelar
Asparagina	A139, B121, B123, B139, C,121 C123,	15	Troncular
Glicina	C119	1	Troncular
Serina	B141, D141	2	Troncular

Fonte: Autora (2022).

Tabela 18. Resumo das regiões dos melhores ligantes que mais interagiram com a alfa-hemolisina, selecionados de acordo com a predição do ΔG , dada pelo parâmetro de afinidade.

Moléculas	Ligantes	Regiões que mais interagiram	Quantidade de interações	Tipo de interação	Resíduos da proteína
<i>Derivados da rodanina</i>	AG 55 AG-58 AG-104	Hidrogênio da imida	3	Ligação de H	Glutamato (B11) Asparagina (C121) Asparagina (D121)
		Carbonila	2	Ligação de H	Lisina (B147) Asparagina (C123)
		Anel da rodanina	3	Pi-sigma Pi-alquila	Metionina (A113) Metionina (B113) Lisina (B147)
		Anel aromático	3	Pi-sigma Pi-enxofre	Metionina (A113) Metionina (A113) Metionina (G113)
		Tionila	1	Ligação de H	Asparagina (B123)
		Hidrogênio do fenol	1	Ligação de H	Asparagina (B139)
<i>Derivados da tiazolidina</i>	GQ-294 GQ-310 GQ-443	Carbonila	5	Ligação C-H Ligação de H	Asparagina (A139) Asparagina (B121) Asparagina (B123) Asparagina (C139) Glicina (C119) Serina (D141)
					Asparagina (C121) Serina (B141)
		Oxigênio do grupo nitro	1	Ligação de H	Asparagina (B121)
		Hidrogênio do fenol	1	Ligação de H	Asparagina (D121)
		Oxigênio do fenol	1	Ligação de H	Asparagina (C123)

Fonte: Autora (2022).

6. DISCUSSÃO

Todos os ligantes interagiram com as diferentes regiões do canal iônico da α -HL (Figura 15), demonstrando haver potencial de bloqueio, no entanto algumas características devem ser levadas em consideração. O DockThor ranqueia as melhores conformações de um mesmo ligante de acordo com a sua energia total, que corresponde à soma de todas as energias do sistema, ou seja, a energia de Coulomb, van der Waals e energia interna. Quanto menor a energia total, melhor a pose do ligante selecionado, como visto nas tabelas de energia de interação (Tabelas 4, 6, 8, 10, 12 e 14), com as poses selecionadas de acordo com a menor energia total.

Para selecionar onde o ligante melhor se encaixou considerando as diferentes regiões da proteína, utilizou-se o parâmetro de afinidade, correspondente à predição do ΔG de ligação (Tabela 16). Após selecionar as melhores regiões onde cada ligante interagiu, foi usado como parâmetro também o ΔG para comparar os diferentes ligantes. Nesse caso, o ligante AG-55 apresentou o menor ΔG na região anelar, com -7.129 kcal/mol (Tabela 16). Isso significa que a interação entre o AG-55 e a região anelar da α -HL formou o complexo mais estável entre todos os ligantes apresentados. De maneira geral, os ligantes apresentaram equilíbrio entre as energias de van der Waals e Coulomb, significando que apresentaram, respectivamente uma boa superfície de contato molecular entre o receptor e os ligantes e uma predisposição para interações iônicas, na qual as forças eletrostáticas são essenciais (ALMEIDA, 2011; VERLI, 2014).

A região do canal iônico da α -HL que apresentou número predominante de interações intermoleculares com os ligantes foi a região troncular. No entanto, o AG-55, considerado o melhor ligante, ligou-se com a região anelar. Além disso, este ligante apresentou oito interações químicas, sendo duas de hidrogênio, duas pi-sigma, duas pi-enxofre e duas interações pi-alquila (Tabela 5). Uma das interações de hidrogênio ocorreu entre o aminoácido glutamato (B111) e a imida presente na rodanina, com distância de 1.77 Å. Outra interação de hidrogênio ocorreu entre o aminoácido lisina (B147) e a carbonila também da rodanina, com distância de 2.57 Å (Figura 9).

As ligações de hidrogênio são consideradas as mais importantes de todas interações não covalentes direcionadas entre biomoléculas (CHEN *et al*, 2016), consideradas um forte parâmetro de afinidade de ligação do complexo receptor-ligante. Além disso, são consideradas as mais fortes entre as interações intermoleculares, apresentando também as menores distâncias em Å. Esse fator pode ser considerado um indicativo da força de atração resultante da

eletronegatividade entre o hidrogênio e um átomo mais eletronegativo como o flúor, o oxigênio ou o nitrogênio.

No caso da ligação envolvendo o glutamato (B111), o hidrogênio foi disponibilizado pelo ligante, possivelmente com o ânion do oxigênio presente no glutamato. Já o resíduo de lisina (B147), ligou-se com o oxigênio do ligante, sendo o hidrogênio fornecido pelo próprio aminoácido. Além da ligação de hidrogênio, um outro tipo de ligação que merece destaque é a pi-sigma. Trata-se de uma ligação que ocorre entre elétrons de uma ligação sigma e elétrons de uma ligação pi (GLEITER, 1987). Inicialmente ocorreu entre o resíduo de metionina (A113) e o anel aromático do ligante, com distância de 3.68 Å. Outro aminoácido que demonstrou essa interação, dessa vez com o anel da rodanina, foi a lisina (B147), com distância de 3.64 Å. Foi a mesma lisina que já havia interagido com a ligação de hidrogênio citada acima (Figura 9).

Também houve uma interação pi-enxofre entre o aminoácido metionina A113 e G113 e o anel aromático do ligante, com distância respectivamente de 4.00 e 5.89 Å (Tabela 5). As interações pi-enxofre são consideradas energeticamente favoráveis do ponto de vista químico e ocorrem entre o átomo de enxofre e sistemas aromáticos pi (RINGER; SENENKO; SHERRILL, 2007). Apesar de haver uma tionila presente no ligante, o enxofre da ligação fornecido foi do aminoácido metionina da proteína, que ligou-se com o anel aromático presente no ligante. Por fim, o ligante AG-55 também apresentou ligações pi-alquila, que ocorrem entre elétrons-pi e um grupo alquila (FOKOUE, 2020). Essa interação ocorreu entre os aminoácidos metionina (A113 e B113), com distâncias de 5.25 e 5.01 Å, respectivamente.

Os ligantes AG-104, GQ-294, GQ-310 e GQ443 (Tabelas 9, 11, 13 e 15), apresentaram três ligações de hidrogênio, todas presentes na região troncular (Figura 15), sendo apenas o ligante AG-58 o único a apresentar duas ligações (Tabela 7). O único que apresentou interações além das de hidrogênio foi o GQ-294, que apresentou, também, duas carbono-hidrogênio na região troncular, com distância em Å bem próxima das ligações de hidrogênio (Figura 12). A ligação carbono-hidrogênio ocorreu entre a carbonila do ligante e os aminoácidos glicina (C119) e serina (D141), com distâncias respectivamente de 2.83 e 3.28 Å.

Apesar de não ter sido selecionado como o complexo mais estável, a interação da α -HL com o ligante GQ-310 na região anelar apresentou cinco ligações de hidrogênio (APÊNDICE E), chamando a atenção pela quantidade de ligações fortes e ainda em uma região considerada importante para as interações de ligantes como a anelar, com ΔG de -6.001 kcal/mol (Tabela 12). Apesar de o ligante GQ-310 ter formado um complexo com um menor ΔG na região troncular de -6.743 kcal/mol, apresentou apenas duas ligações de hidrogênio como mencionado

anteriormente. Apesar da diferença de ΔG não ser tão distante e o ΔG maior ter apresentado mais ligações, o complexo mais estável eleito foi o da região troncular (Figura 13).

O resíduo da α -HL que mais interagiu com as moléculas foi o aminoácido asparagina, ligando-se 15 vezes com os ligantes AG-58, AG-104, GQ-294, GQ-310 e GQ-443 na região troncular, principalmente por meio de interações de hidrogênio (Figuras 10, 11, 12, 13 e 14). Isso ocorreu provavelmente devido ao aminoácido asparagina possuir muitos hidrogênios e oxigênios lábeis em sua estrutura, facilitando essas interações de hidrogênio.

Em seguida, o aminoácido metionina foi bastante presente, ligando-se 5 vezes na região anelar do ligante AG-55 (Tabela 5), com ligações de hidrogênio, pi-sigma e pi-alquila (Tabela 17). Com relação aos ligantes, destacaram-se com a presença de ligações de hidrogênio, além disso, as regiões que mais interagiram foram os oxigênios da carbonila, hidrogênios lábeis, o anel da rodanina e anéis aromáticos (Tabela 18).

Analizando todos os parâmetros, dentre todos os ligantes estudados, o ligante AG-55 foi considerado o mais estável, principalmente na região anelar, que, conforme relatado em outros estudos (MELO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2022), é uma região de interesse farmacológico, pois trata-se de uma região sensível do canal da α -HL devido a vários fatores como, por exemplo, o menor diâmetro na parte interna da proteína. Segundo o estudo de SONG *et al.* (1996), a região de constrição ou anelar possui alguns aminoácidos de destaque que a compõem, como o Glutamato 111, a Lisina 147 e a Metionina 113. O fato de os resultados do presente estudo demonstrarem que o melhor ligante interagiu com essa região pode ser um resultado considerado favorável (Tabela 17). O aminoácido metionina (posição 113 nas subunidades A, B e G) foi o mais presente nas interações, enquanto o aminoácido glutamato (B111) foi o que apresentou interações de hidrogênio e menor distância, com 1.77 Å. Além disso, o aminoácido lisina (B147) também apresentou interações de hidrogênio.

O fato de haver interações fortes e um complexo estável em uma região importante da proteína pode ser considerado um resultado favorável do ponto de vista farmacológico. A interação dos ligantes com os resíduos das subunidades A, B, C, D e G (Tabela 17) podem induzir mudanças conformacionais na proteína, algo que poderia bloquear a passagem de moléculas importantes por meio do canal, como por exemplo as de ATP e, também, o bloqueio da corrente iônica gerada pelo influxo de íons Ca^{2+} e efluxo íons K^{+} , responsáveis por causar desequilíbrios osmóticos e lise celular, importante fator de virulência de *S. aureus*.

No entanto, são necessários mais estudos envolvendo a interação entre os derivados e o protômero da α -HL para avaliar estratégias de impedimento da oligomerização da proteína, desta forma, impossibilitando a formação do canal proteico e consequentemente a lise celular.

Outros estudos interessantes seriam os de dinâmica molecular, que consideram a flexibilidade de receptores e ligantes e a cinética das reações. Ademais, é necessário ter apoio também de estudos experimentais visando um melhor entendimento da interação dos candidatos a fármacos no bloqueio da α -HL, limitando a virulência de *S. aureus*.

7. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o ligante derivado da rodanina AG-55 estava presente no complexo mais estável e apresentou maior afinidade com o canal iônico da alfa-hemolisina, exibindo importantes interações intermoleculares como as de hidrogênio, pi-sigma, pi-enxofre e pi-alquila com a região anelar (construção) do canal, assim, representando um importante candidato a fármaco bloqueador.

Esse resultado corrobora com os resíduos informados pela literatura como os mais presentes da região anelar, como o glutamato 111, lisina 147 e metionina 113. Além disso, os outros candidatos a fármacos AG-104, GQ-443, GQ 294, AG-58 e GQ-310 apresentaram, respectivamente, uma boa afinidade com a toxina, com a predominância de ligações de hidrogênio e, sobretudo, com os resíduos de asparagina. Os resultados indicaram afinidade dessas moléculas pelo canal da alfa-hemolisina nas subunidades A, B, C, D e G, permitindo inferir uma possível mudança conformacional da proteína a ponto de alterar seu estado de canal não-seletivo na membrana do hospedeiro e, assim, bloquear a passagem de moléculas importantes como o ATP e os íons Ca^{2+} e K^{+} .

A presença de hidrogênios e oxigênios lábeis dos ligantes proporcionou uma certa facilidade de formar interações de hidrogênio, consideradas as mais fortes entre as intermoleculares. Além disso, a presença dos anéis, sobretudo anéis aromáticos facilitam interações do tipo pi, como as pi-alquilas, pi-enxofre e pi-sigma. Por fim, são necessários mais estudos comparativos e experimentais a fim de aprofundarem estes resultados preditivos, pois apenas o AG-55 se ligou em uma região de interesse, enquanto os demais se ligaram na região troncular. Por fim, desenvolver moléculas de baixo peso molecular, com potencial bloqueador/inibidor, para interagirem com a alfa-hemolisina pode ser uma estratégia terapêutica promissora, sendo os estudos computacionais grandes aliados, auxiliando na prospecção de novos medicamentos.

REFERÊNCIAS

- ABDELKHALEK, A. *et al.* In vitro antibacterial activity of rhodanine derivatives against pathogenic clinical isolates. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0164227, 2016.
- ABUSETTA, A. *et al.* Design, Synthesis, *in vitro* Antibacterial Activity, and *Docking* studies of New Rhodanine Derivatives. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 15-34, 2020.
- ALBERS, H. M. H. G *et al.*, Integrating chemical and genetic silencing strategies to identify host kinase-phosphatase inhibitor networks that control bacterial infection. **ACS Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 414-422, 2014.
- ALEGAON, S. G. *et al.* Novel imidazo [2, 1-b][1, 3, 4] thiadiazole carrying rhodanine-3-acetic acid as potential antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, p. 1917-1921, 2012.
- ALMEIDA, D. M. **Dockthor: implementação, aprimoramento e validação de um programa de atracamento receptor-ligante**. Laboratório Nacional de Computação Científica, 2011.
- AZIZ, H. A. *et al.* Thiazolidine-2, 4-dione-linked ciprofloxacin derivatives with broad-spectrum antibacterial, MRSA and topoisomerase inhibitory activities. **Molecular Diversity**, v. 26, n. 3, p. 1743-1759, 2022.
- BANSAL, G. *et al.* An overview on medicinal perspective of thiazolidine-2, 4-dione: A remarkable scaffold in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Advanced Research**, v. 23, p. 163-205, 2020.
- BARROS, C, D. *et al.* Síntese e atividade anti-inflamatória de novas arilideno-tiazolidina-2,4-dionas como ligantes de PPAR γ . **Química Bioorgânica e Medicinal** , v. 18, n. 11, pág. 3805-3811, 2010.

BERUBE, B. J; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. **Toxins**, v. 5, n. 6, p. 1140-1166, 2013.

BHAKDI, S. *et al.* Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 11, p. 3512-3519, 1989.

BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio Visualizer, v21.1.0.20298, **San Diego: Dassault Systèmes**, 2021.

BROOIJMANS, N; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335-373, 2003.

BUKOWSKI, M; WLADYKA, B; DUBIN, G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1148-1165, 2010.

CASSIDY, P; HARSHMAN, S. Studies on the binding of staphylococcal 125I-labeled α -toxin to rabbit erythrocytes. **Biochemistry**, v. 15, n. 11, p. 2348-2355, 1976.

CHEN, D. *et al.* Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. **Science Advances**, 2016; 2 (3): e1501240.

CHEUNG, G; BAE, J. S.; OTTO, Ml. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021.

CHRISTAKI, Ei; MARCOU, M; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020.

CHUA, K. YL *et al.* Population genetics and the evolution of virulence in *Staphylococcus aureus*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 554-562, 2014.

CUTSHALL, N. S; O'DAY, C; PREZHDO, M. Rhodanine derivatives as inhibitors of JSP-1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 14, p. 3374-3379, 2005.

DELEO, F. R. *et al.* Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 44, p. 18091-18096, 2011.

DESAI, N. C. *et al.* Synthesis and antibacterial and cytotoxic activities of new N-3 substituted thiazolidine-2, 4-dione derivatives bearing the pyrazole moiety. **Archiv der Pharmazie**, v. 347, n. 7, p. 523-532, 2014.

DINGES, M. M; ORWIN, P. M; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

EDWARDS, D. R; HANDSLEY, M. M; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 5, p. 258-289, 2008.

ERGENÇ, N. *et al.* Synthesis and Hypnotic Activity of New 4-Thiazolidinone and 2-Thioxo-4, 5-imidazolidinedione Derivatives. **Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry**, v. 332, n. 10, p. 343-347, 1999.

FAN, W *et al.* Online bioinformatics teaching practice: Comparison of popular docking programs using SARS-CoV-2 spike RBD–ACE2 complex as a benchmark. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 49, n. 6, p. 833-840, 2021.

FEINSTEIN, W. P.; BRYLINSKI, M. Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets. **Journal of Cheminformatics**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2015.

FETTACH, S. *et al.* Biological, toxicological and molecular docking evaluations of isoxazoline-thiazolidine-2, 4-dione analogues as new class of anti-hyperglycemic agents. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-13, 2021.

FOKOUÉ, H. *et al.* Há algo novo no reconhecimento molecular aplicado à química medicinal?. **Química Nova**, v. 43, p. 78-89, 2020.

GLEITER, R. Pi-sigma interactions: Experimental evidence and its consequences for the chemical reactivity of organic compounds. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1585-1594, 1987.

GRIMMINGER, F. *et al.* Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins Escherichia coli hemolysin and staphylococcal alpha-toxin. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 4, p. 1909-1916, 1997.

GRUMANN, D; NÜBEL, U; BRÖKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins—their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583-592, 2014.

GUEDES, I. A. *et al.* Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2021.

GUPTA, M; SHARMA, R; KUMAR, A. *Docking* techniques in pharmacology: How much promising?. **Computational Biology and Chemistry**, v. 76, p. 210-217, 2018.

HAMMAD, S. G. *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of new halogenated 1, 3-Thiazolidin-4-ones. **Bioorganic Chemistry**, v. 95, p. 103517, 2020.

HARRIS, L. G. *et al.* An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **European Cells & Materials**, v. 4, n. 3, p. 100-20, 2002.

HUANG, S-Y; ZOU, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3016-3034, 2010.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

JAYASINGHE, L; MILES, G; BAYLEY, H. Role of the amino latch of staphylococcal α -hemolysin in pore formation: a co-operative interaction between the N terminus and position 217. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 2195-2204, 2006.

KELMANI C. R; RAJU, S; PATIL, S. A. Aminoglycoside-resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Current Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 558-562, 2008.

KHAN, M. A. *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of thiazoline derivatives in combination with conventional antibiotics against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* isolated from abscess drainage samples. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, 2020.

KITCHEN, D. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.

KNOX, K. W; WICKEN, A. J. Immunological properties of teichoic acids. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 215-257, 1973.

KRÁTKÝ, M; VINŠOVÁ, J; STOLARŽÍKOVÁ, J. Antimicrobial activity of rhodanine-3-acetic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1839-1845, 2017.

KUMAR, G. *et al.* Discovery of a rhodanine class of compounds as inhibitors of Plasmodium falciparum enoyl-acyl carrier protein reductase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2665-2675, 2007.

LIU, J. C. *et al.* Synthesis and evaluation of the antimicrobial activities of 3-((5-phenyl-1, 3, 4-oxadiazol-2-yl) methyl)-2-thioxothiazolidin-4-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 405-410, 2014.

LIZAK, M; YAROVINSKY, T. O. Phospholipid scramblase 1 mediates type I interferon-induced protection against staphylococcal α -toxin. **Cell Host & Microbe**, v. 11, n. 1, p. 70-80, 2012.

MAGALHÃES, C. S. *et al.* A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands. **Information Sciences**, v. 289, p. 206-224, 2014.

- MELO, M. C. A. *et al.* Inhibition of the hemolytic activity caused by *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin through isatin-Schiff copper (II) complexes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 1, p. fnv207, 2016.
- MENESTRINA, G. *et al.* Ion channels and bacterial infection: the case of β -barrel pore-forming protein toxins of *Staphylococcus aureus*. **FEBS Letters**, v. 552, n. 1, p. 54-60, 2003.
- MERZLYAK, P. G. *et al.* Conductance and ion selectivity of a mesoscopic protein nanopore probed with cysteine scanning mutagenesis. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 5, p. 3059-3070, 2005.
- MOELLERING JR; Robert C. Current treatment options for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 7, p. 1032-1037, 2008.
- MUGHAL, A; KUMAR, D; VIKRAM, A. Effects of Thiazolidinediones on metabolism and cancer: Relative influence of PPAR γ and IGF-1 signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 768, p. 217-225, 2015.
- NAIM, M J *et al.*, Therapeutic journey of 2, 4-thiazolidinediones as a versatile scaffold: An insight into structure activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 129, p. 218-250, 2017.
- NEUDERT, G; KLEBE, G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein–ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2731-2745, 2011.
- OLIVEIRA, D; BORGES, A; SIMÕES, M. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. **Toxins**, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.
- OMAR, K. *et al.* Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 426-432, 2010.
- PENESYAN, A; GILLINGS, M; PAULSEN, I. T. Antibiotic discovery: combatting bacterial

resistance in cells and in biofilm communities. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5286-5298, 2015.

PINZI, L; RASTELLI, G. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery.

International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

RAJAMAKI, S. *et al.* Exploration of novel thiobarbituric acid-, rhodanine-and thiohydantoin-based HIV-1 integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 13, p. 3615-3618, 2009.

RASHIDIEH, B. *et al.* A molecular modeling based screening for potential inhibitors to alpha hemolysin from *Staphylococcus aureus*. **Bioinformation**, v. 11, n. 8, p. 373, 2015.

RAUTER, A. P. *et al.* Bioactive Pseudo-C-nucleosides Containing Thiazole, Thiazolidinone, and Tetrazole Rings. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 275-296, 2005.

RINGER, A. L.; SENENKO, A; SHERRILL, C. D. Models of S/ π interactions in protein structures: Comparison of the H₂S–benzene complex with PDB data. **Protein Science**, v. 16, n. 10, p. 2216-2223, 2007.

ROSE, F. *et al.* Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus* α -toxin. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, n. 2, p. L207-L214, 2002.

SANTANA, C. A. *et al.*, GRaSP: a graph-based residue neighborhood strategy to predict binding sites. **Bioinformatics**, v. 36, n. Supplement_2, p. i726-i734, 2020.

SCHEMMEL, K. E; PADIYARA, R. S; D'SOUZA, J. J. Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 24, n. 5, p. 354-360, 2010.

SCHERR, T. D. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms induce macrophage dysfunction through leukocidin AB and alpha-toxin. **MBio**, v. 6, n. 4, p. e01021-15, 2015.

SEALS, D. F; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes & Development**, v. 17, n. 1, p. 7-30, 2003.

SHOCKMAN, G. D; BARREN, J. F. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 501-527, 1983.

SONG, L. *et al.* Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. **Science**, v. 274, n. 5294, p. 1859-1865, 1996.

STINEAR, T. P. *et al.* Adaptive change inferred from genomic population analysis of the ST93 epidemic clone of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 2, p. 366-378, 2014.

STJERNSCHANTZ, E; OOSTENBRINK, C. Improved ligand-protein binding affinity predictions using multiple binding modes. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 11, p. 2682-2691, 2010.

STANZIONE, F; GIANGRECO, I; COLE, J. C. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 273-343, 2021.

SUTTROP, N. *et al.* Staphylococcal alpha-toxin-induced PGI₂ production in endothelial cells: role of calcium. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 248, n. 1, p. C127-C134, 1985.

TEJCHMAN, W. *et al.* Highly efficient microwave synthesis of rhodanine and 2-thiohydantoin derivatives and determination of relationships between their chemical structures and antibacterial activity. **RSC Advances**, v. 9, n. 67, p. 39367-39380, 2019.

TOMASIC, T. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of 5-ylidenethiazolidin-4-ones and 5-benzylidene-4, 6-pyrimidinediones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1667-1672, 2010.

TURLEJ, A; HRYNIEWICZ, W; EMPEL, J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 95, 2011.

VASCONCELOS, A. *et al.* Thiazolidine-2, 4-dione derivative exhibits antitumoral effect and reverts behavioral and metabolic changes in a model of glioblastoma. **Metabolic Brain Disease**, p. 1-7, 2022.

VELEC, H FG; GOHLKE, H; KLEBE, G. DrugScoreCSD knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6296-6303, 2005.

VERLI, Hugo. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 2014.

WANG, X. *et al.* Inhibitory Effect of Andrographis paniculata Lactone on *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 891943, 2022.

WILKINSON, B. J. The staphylococci in human disease. **London: Churchill Livingston**, 1997.

WU, G *et al.* Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER—A CHARMM-based MD docking algorithm. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 13, p. 1549-1562, 2003.

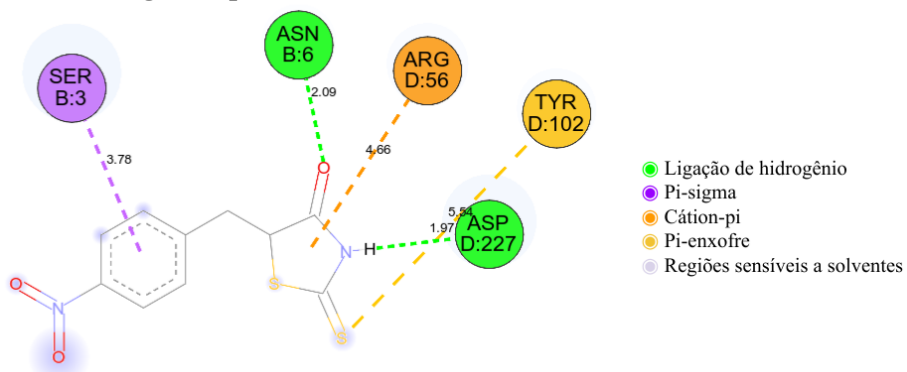
ZACHARIAS, M. **Protein-protein complexes: Analysis, modeling and drug design**. World Scientific, 2010.

APÊNDICE A - Complexo canal α -HL/AG-55

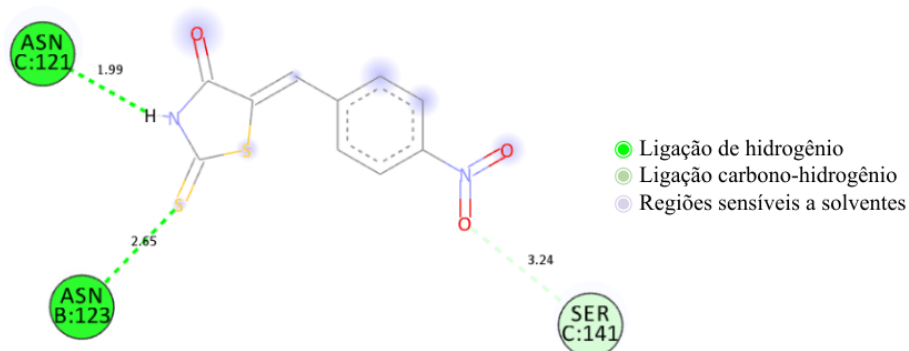
Região copal e troncular

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
Copal	Ligação de H	2	2.09	Asparagina (B6)
			1.97	Aspartato (D227)
	Pi-sigma	1	3.78	Serina (B3)
	Cátion-Pi	1	4.66	Arginina (D56)
	Pi-enxofre	1	5.54	Tirosina (D102)
Troncular	Ligação de H	2	2.65	Asparagina (B123)
			1.99	Asparagina (C121)
	Ligação C-H	1	3.24	Serina (C141)

AG-55 - Região copal



AG-55 - Região troncular

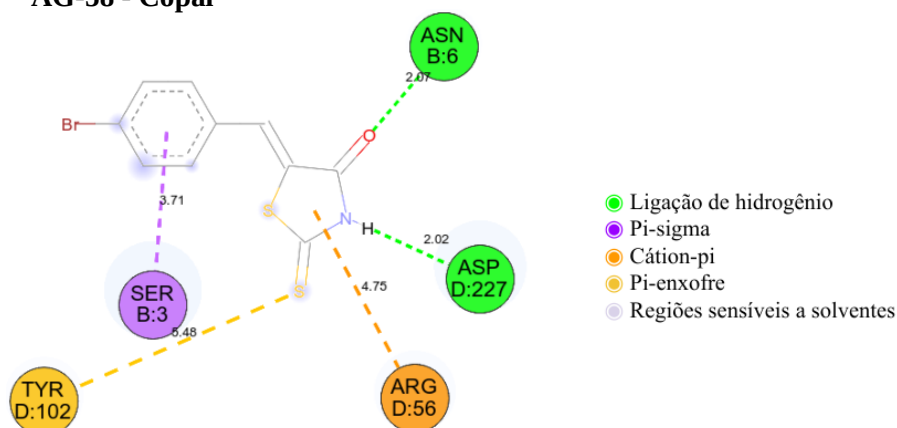


APÊNDICE B - Complexo canal α -HL/AG-58

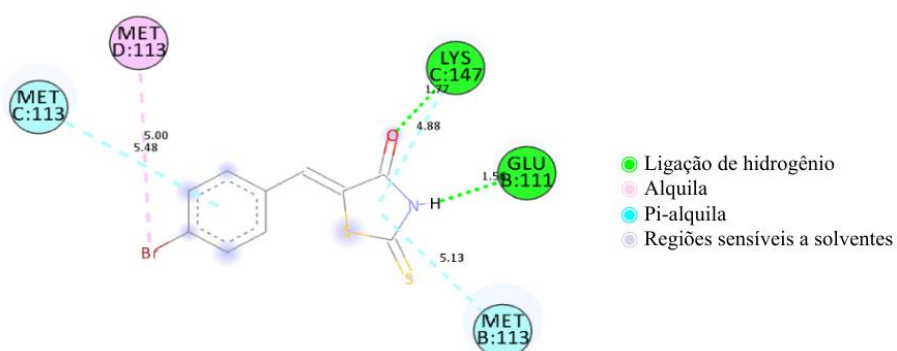
Região copal e anelar

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
Copal	Ligação de H	2	2.07	Asparagina (B6)
			2.02	Aspartato (D227)
	Pi-sigma	1	3.71	Serina (B3)
	Cátion-Pi	1	4.75	Arginina (D56)
	Pi-enxofre	1	5.48	Tirosina (D102)
Anelar	Ligação de H	2	1.56	Glutamato (B111)
			1.77	Lisina (C147)
	Alquila	1	5.00	Metionina (D113)
	Pi-alquila	3	4.88	Lisina (C147)
			5.13	Metionina (B113)
			5.48	Metionina (C113)

AG-58 - Copal



AG-58 - Anelar

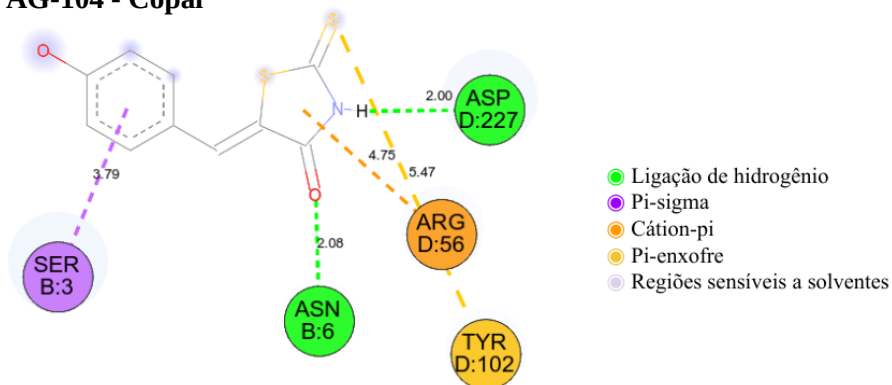


APÊNDICE C- Complexo canal α -HL/AG-104

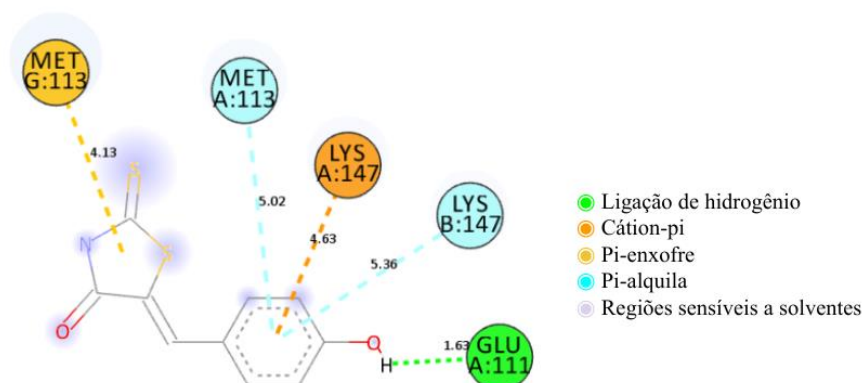
Região copal e anelar

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
Copal	Ligação de H	2	2.08	Asparagina (B6)
			2.00	Aspartato (D227)
	Pi-sigma	1	3.79	Serina (B3)
	Cátion-pi	1	4.75	Arginina (D56)
	Pi-enxofre	1	5.46	Tirosina (D102)
Anelar	Ligação de H	1	1.63	Glutamato (A111)
			4.63	Lisina (A147)
	Pi-enxofre	1	4.13	Metionina (G113)
	Pi-alquila	3	5.02	Metionina (A113)
			5.36	Lisina (B147)

AG-104 - Copal



AG-104 - Anelar

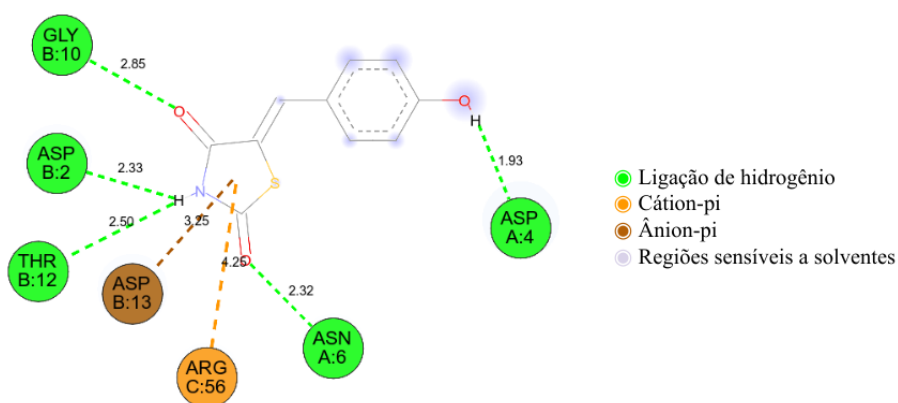


APÊNDICE D - Complexo canal α -HL/GQ-294

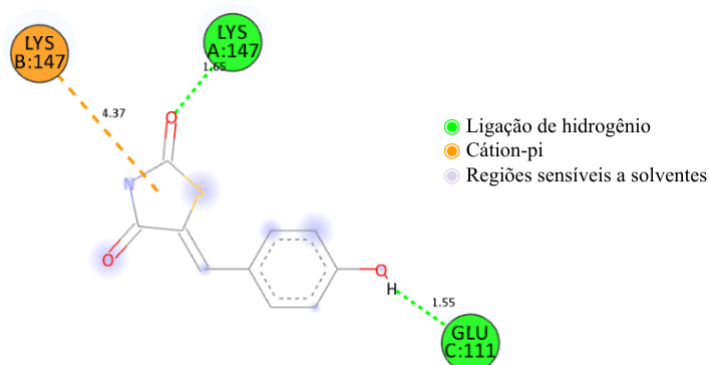
Região copal e anelar

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
Copal	Ligação de H	5	1.93	Aspartato (A4)
			2.33	Aspartato (B2)
			2.32	Asparagina (A6)
			2.85	Glicina (B10)
			2.50	Treonina (B12)
	Cátion-pi	1	4.25	Arginina (C56)
Anelar	Ânion-pi	1	3.25	Aspartato (B13)
	Ligação de H	2	1.55	Glutamato (C111)
			1.65	Lisina (A147)
	Cátion-pi	1	4.37	Lisina (B147)

GQ-294 - Copal



GQ-294 - Anelar

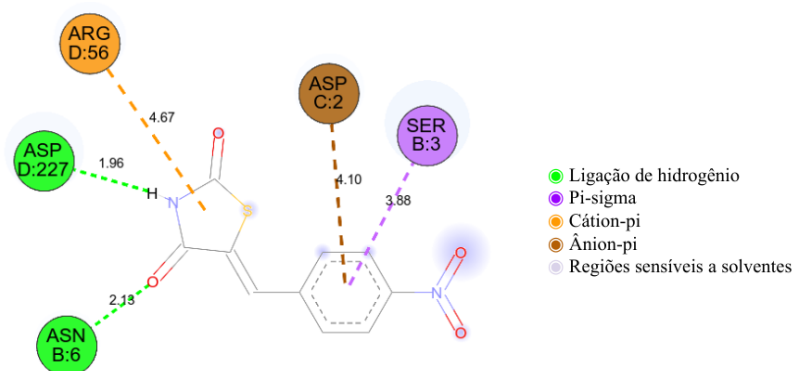


APÊNDICE E - Complexo canal α -HL/GQ-310

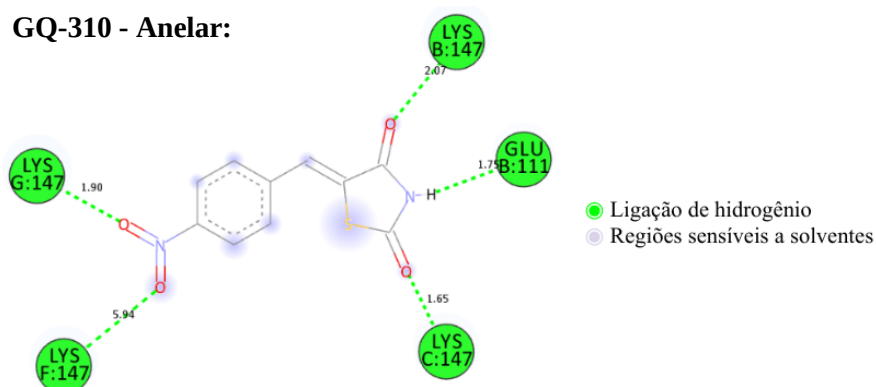
Região copal e anelar

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
<i>Copal</i>	Ligação de H	2	2.13	Asparagina (B6)
			1.93	Aspartato (D227)
	Pi-sigma	1	3.88	Serina (B3)
	Cátion-pi	1	4.67	Arginina (D56)
	Ânion-pi	1	4.10	Aspartato (C2)
<i>Anelar</i>	Ligação de H	5	1.75	Glutamato (B111)
			2.07	Lisina (B147)
			1.65	Lisina (C147)
			5.94	Lisina (F147)
			1.90	Lisina (G147)

GQ-310 - Copal:



GQ-310 - Anelar:

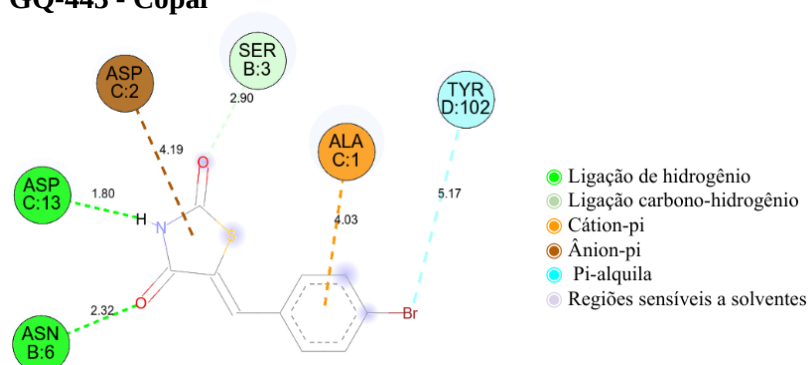


APÊNDICE F - Complexo canal α -HL/GQ-443

Região copal e anelar

Região	Interação intermolecular	Quantidade de interações	Distância de ligação (Å)	Resíduo de ligação
<i>Copal</i>	Ligação de H	2	2.32	Asparagina (B6)
			1.80	Aspartato (C13)
	Ligação C-H	1	2.90	Serina (B3)
	Cátion-pi	1	4.03	Alanina (C1)
	Ânion-pi	1	4.19	Aspartato (C2)
	Pi-alquila	1	5.17	Tirosina (D102)
<i>Anelar</i>	Ligação de H	2	2.00	Lisina (A147)
			1.69	Glutamato (A111)
	Pi-sigma	1	3.55	Lisina (A147)
	Pi-enxofre	1	3.72	Metionina (G113)
	Pi-alquila	2	5.17	Lisina (B147)
			4.93	Metionina (A113)

GQ-443 - Copal



GQ-443 - Anelar

