

## **Avaliação *in silico* de derivados naftoquinônicos frente à NSP9 do SARS-COV-2**

### ***In silico* evaluation of naphthoquinonic derivatives against SARS-COV-2 NSP9**

DOI:10.34117/bjdv8n6-153

Recebimento dos originais: 21/04/2022

Aceitação para publicação: 31/05/2022

#### **Aryane Maia de Castro**

Acadêmica de Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Endereço: Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I, Manaus-AM

Prédio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, Setor Sul do Campus

Universitário da Universidade Federal do Amazonas, CEP: 69080-900

E-mail: aryane@ufam.edu.br

#### **Nicole de Souza Farias**

Acadêmica de Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Endereço: Rua Primeiro de Maio casa 6A, Riacho Doce 1, Cidade Nova 1

E-mail: nicky.farias03@gmail.com

#### **Matheus Fonseca de Melo**

Acadêmico de Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Endereço: Rua Acurana 80, Bloco 21, Apto 407, Cidade Nova, Manaus

CEP: 69090-003

E-mail: matheusfonsmelo@gmail.com

#### **Rhanna Victória Amaral da Silva**

Mestranda em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Endereço: Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I, Manaus-AM

Prédio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, Setor Sul do Campus

Universitário da Universidade Federal do Amazonas, CEP: 69080-900

E-mail: rhana2011@gmail.com

#### **Fernanda Guilhon-Simplicio**

Doutora em Biodiversidade e Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas UFAM e em Ciências Farmacêuticas pela Universidade da Antuérpia - UAntwerpen

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Endereço: Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 6200, Coroado I, Manaus-AM

Prédio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, Setor Sul do Campus

Universitário da Universidade Federal do Amazonas CEP: 69080-900

E-mail: guilhon\_simplicio@ufam.edu.br

## RESUMO

O SARS-CoV-2 é o agente etiológico da COVID-19, que representa uma emergência de saúde global. A proteína Nsp9 Replicase é crítica para a maquinaria de RNA replicase e parece desempenhar um papel fundamental na transcrição do genoma do RNA do SARS-CoV-2. Dessa forma, essa proteína não estrutural pode ser um alvo potencial para a pesquisa de fármacos capazes de inibir a progressão viral. Em vista das poucas opções terapêuticas disponíveis para essa doença, buscou-se planejar, por meio de triagem virtual, derivados naftoquinônicos com potencial de inibição da Nsp9 Replicase e que apresentassem perfil físico-químicos ideais para candidatos a fármacos. Foram planejados 6 derivados, onde apenas 2 (D5 e D6) obtiveram um perfil de complementariedade com a enzima Nsp9. Quanto ao perfil físico-químico, D5 atende à Regra dos 5 Lipinski. Adicionalmente, as etapas para a sua síntese são simples e de custo acessível, tornando viável sua produção para testes *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, este trabalho traz uma proposta de nova molécula de fácil obtenção e características farmacocinéticas apropriadas e que apresenta potencial de inibição de uma importante proteína de SARS-CoV-2, responsável por um dos maiores problemas de saúde pública da era moderna.

**Palavras-chave:** Nsp9, triagem virtual, naftoquinona, antiviral.

## ABSTRACT

SARS-CoV-2 is the etiological agent of COVID-19, which represents a global health emergency. The Nsp9 Replicase protein is critical for the RNA replicase machinery and appears to play a key role in the transcription of the SARS-CoV-2 RNA genome. Thus, this nonstructural protein may be a potential target for drug research that can inhibit viral progression. In view of the few therapeutic options available for this disease, we sought to plan, through virtual screening, naphthoquinone derivatives with potential inhibition of Nsp9 Replicase and that presented ideal physical-chemical profiles for drug candidates. Six derivatives were planned, where only 2 (D5 and D6) obtained a complementarity profile with the Nsp9 enzyme. As for the physicochemical profile, D5 meets the 5 Lipinski's Rule. Additionally, the steps for its synthesis are simple and affordable, making its production feasible for *in vitro* and *in vivo* tests. Thus, this work brings a proposal of a new molecule of easy obtainment and appropriate pharmacokinetic characteristics that presents potential for inhibition of an important protein of SARS-CoV-2, responsible for one of the biggest public health problems of the modern era.

**Keywords:** Nsp9, virtual screening, naphthoquinone, antiviral.

## 1 INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19, teve seus primeiros casos relatados como casos de pneumonia grave, cuja etiologia até então era desconhecida, em Wuhan, província de Hubei, na China, em dezembro de 2019. Com ferramentas de sequenciamento genético, foi constatado que o agente etiológico era um vírus da família Coronaviridae, posteriormente denominado SARS-CoV-2, que se espalhou pelo mundo ocasionando milhares de mortes. Os modos mais comuns de transmissão incluem a transmissão direta, através de gotículas produzidas durante

a tosse, espirro e fala e transmissão indireta através de objetos contaminados, seguido de contato com a boca, nariz ou olhos.<sup>1-3</sup>

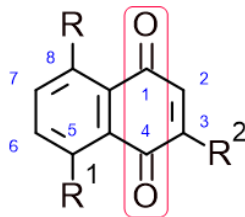
Sabe-se que os coronavírus (CoVs) apresentam grandes genomas de RNA, em que a replicação requer um complexo de replicação / transcrição de RNA dependente de RNA. O genoma SARS-CoV-2 apresenta duas estruturas de leitura aberta, conhecidas como ORFs, tendo como principais ORF1a e ORF1b, que codificam as proteínas não estruturais.<sup>4</sup> As proteínas não estruturais (NSPs) desempenham papéis de extrema importância na montagem desse complexo e nas funções enzimáticas associadas. Além disso, vários NSPs não enzimáticos auxiliam na função da RNA polimerase dependente de RNA.<sup>5</sup>

A Nsp9 Replicase, uma proteína dimérica, forma um núcleo de seis fitas  $\beta$ , projetando loops estendidos e incluindo uma fita  $\beta$  N-terminal e uma hélice  $\alpha$  C-terminal. Essas regiões N- e C-terminais são essenciais para a função de replicase do dímero Nsp9 e para a replicação de vírus da família CoV.<sup>5,6</sup> As alças que conectam as fitas  $\beta$ 2-3 (L23) e  $\beta$ 3-4 (L34) da Nsp9 Replicase são carregadas positivamente e ricas em glicina, levando a hipótese de que essas regiões participam da ligação e interação do RNA.<sup>5</sup>

Essa enzima é considerada um fator de virulência importante do SARS-CoV, sendo 97% homólogo na família CoV, incluindo SARS-CoV 1 e 2, sugerindo alto grau de conservação funcional<sup>5-8</sup>. Também parece desempenhar um papel na transcrição do genoma do RNA do SARS-CoV-2, sendo crítica para a maquinaria de RNA replicase dependente de RNA de CoVs<sup>9</sup>, pois atua na formação da maquinaria do complexo de replicação/transcrição. Dessa forma, sabendo que a Nsp9 Replicase desempenha uma função essencial na replicação viral e levando em conta sua homologia próxima entre os vírus da família Coronaviridae, essa proteína não estrutural pode ser um alvo potencial para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos capazes de inibir a progressão viral.

A utilização de produtos naturais constitui fonte importante para obtenção de substâncias bioativas, onde a química medicinal, através do planejamento por modificação semissintética constitui uma ferramenta importante no desenvolvimento de candidatos a novos fármacos<sup>10,13</sup>. Dentre os produtos naturais, destacam-se as naftoquinonas (figura 1), estruturas bicíclicas contendo dois grupos carbonil identificados nas posições 1, 4 ou 1, 2, sendo este último caso menos frequente.

Figura 1. Estrutura da naftoquinona



As atividades biológicas das naftoquinonas dependem principalmente da posição e da natureza química dos grupos laterais ligados (R). Os derivados de naftoquinonas isolados de fontes vegetais, incluindo, juglona, plumbagina, lausona e lapachol fascinaram os pesquisadores devido à sua abundância, diversidade estrutural e potencial terapêutico, apresentando atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anticâncer e antiparasitária.<sup>14</sup>

Por todo o exposto, este estudo empregou ferramentas *in silico* para planejar e selecionar derivado(s) naftoquinônico(s) com possível atividade contra SARS-CoV-2, bem como avaliar suas características físico-químicas e farmacocinéticas, contribuindo com o desenvolvimento de moléculas candidatas a fármacos contra a COVID-19

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 PLANEJAMENTO DOS DERIVADOS

Foram desenvolvidos seis derivados com base na relação estrutura-atividade da molécula de partida, 1,4-naftoquinona, uma vez que dependendo da posição e natureza química dos grupos laterais ligados, pode apresentar atividade biológica antiviral, bem como em relação as características da estrutura tridimensional do receptor, cujas modificações estruturais foram conduzidas nos carbonos C2, C3 e C4 da naftoquinona. Isto foi planejado a partir do estudo prévio de uma substância da classe das naftoquinonas, o lapachol, que demonstrou atividade *in silico* frente a mesma enzima.<sup>15</sup>

### 2.2 TRIAGEM VIRTUAL

#### 2.2.1 Obtenção dos Alvos

A enzima selecionada como alvo foi a Nsp9 Replicase, sendo obtida do banco de dados de proteínas (PDB) a partir do código 6W9Q, que atendia aos critérios com resolução 2,05 Å, método de obtenção por Difração de Raio X e baixa presença de artefatos. Artefatos como água e reagentes de cristalização foram removidos no programa AutoDockTools – 1.5.6. Após esse procedimento, o arquivo com a enzima foi salvo no formato .pdbqt.

### 2.2.2 Preparo dos ligantes

As moléculas propostas tiveram sua estrutura desenhada no formato bidimensional no programa Chems sketch®<sup>16</sup> e convertidas ao formato tridimensional no programa Avogadro®<sup>17</sup>, onde tiveram suas estruturas otimizadas e a energia conformacional minimizada. Após esse procedimento, os arquivos com os ligantes foram salvos no formato .pdbqt.

### 2.2.3 Ancoragem molecular

O estudo de ancoragem molecular foi realizado utilizando o *software* Autodock Vina®<sup>18</sup>, onde o receptor foi mantido rígido e os ligantes foram flexíveis para explorar as poses mais prováveis. O *Grid box*, grade que delimita o sítio ativo, foi posicionado na região ativa do receptor, englobando todos os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas, ou, os que tivessem alguma relação com sua atividade de acordo com a literatura, de modo a proporcionar uma região de busca conformacional adequada para a realização da ancoragem molecular, mantendo-se o intervalo de busca entre os pontos do grid fixados em 1 Å, e aplicando-se o algoritmo genético Lamarckiano para a análise das interações.

Os resultados foram visualizados no AutoDock Tools®<sup>19</sup> e as interações avaliadas em termos de energia de afinidade de ligação (Kcal/mol), número de ligações de hidrogênio e outras interações formadas entre os resíduos do sítio ativo da macromolécula e o ligante. As imagens 2D dos resultados moleculares de acoplamento foram obtidas usando o *software* Discovery Studio Visualizer 4.0®<sup>20</sup>.

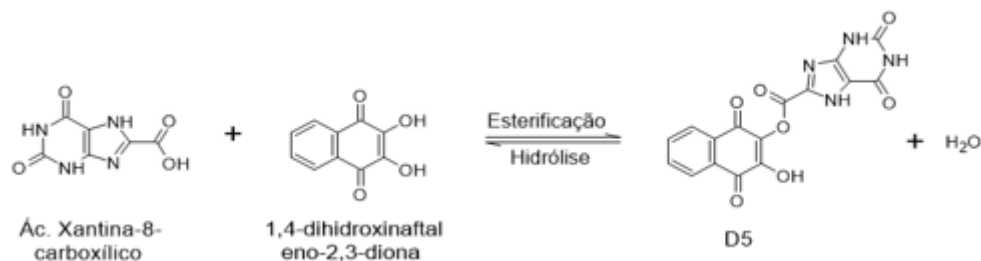
## 2.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A predição dos parâmetros físico-químicos foi realizada utilizando a plataforma SwissADME®<sup>21</sup> para comparação em bancos de dados de compostos submetidos a testes pré-clínicos *in vitro* e/ou *in vivo*, de forma a avaliar os farmacocinética dos derivados propostos.

## 2.4 PROPOSIÇÃO DA ROTA DE SÍNTESE

De modo geral, propôs-se derivados passíveis de serem obtidos por meio de reações químicas com poucas etapas e viáveis para aplicação em larga escala. A reação escolhida foi esterificação de Fischer (figura 2), que consiste no aquecimento de ácidos carboxílicos e álcoois na presença de catalisadores ácidos para produzir ésteres.<sup>22</sup> Na seção de resultados, está detalhada o mecanismo reacional proposto para obtenção do derivado mais promissor.

Figura 2. Reação geral de esterificação para a formação do derivado D5.

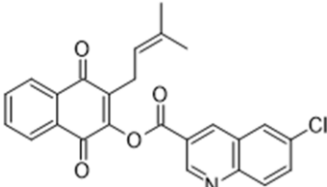
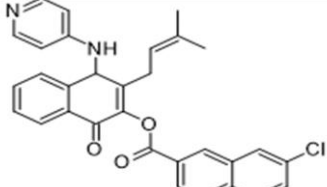
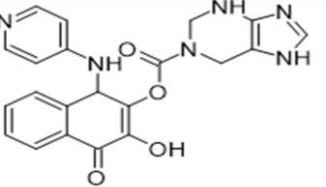
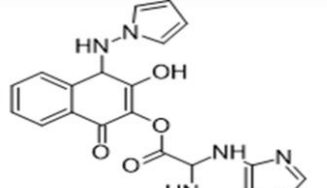
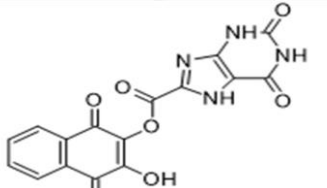
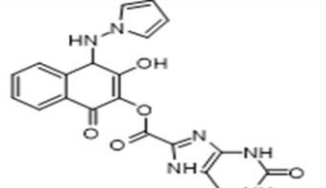


### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PLANEJAMENTO DOS DERIVADOS

Foram planejados 6 derivados naftoquinônicos por estratégia de isosterismo clássico e hibridação molecular, os quais foram codificados de D1 a D6. Com a proposta direcionada para a atividade antiviral, realizou-se modificações no anel o esqueleto da 1,4-naftoquinona, com a adição de heterocíclicos e presença de grupamentos nitrogenados de modo que fossem obtidos compostos de baixa, média e alta polaridade com grande interação com as moléculas alvos. Os anéis heterocíclicos estão presentes em muitos fármacos e apresentam vantagens em relação aos sistemas carbocíclicos, entre as quais maior estabilidade e maior resistência a degradação metabólica.<sup>23</sup> A relação estrutura-atividade da naftoquinona na atividade antiviral também parece estar relacionada com a adição de grupos OH em na posição 8, 5 e 2 do anel.<sup>15</sup> No quadro 1 são apresentadas as estruturas dos derivados naftoquinônicos com as modificações propostas.

Quadro 1. Estruturas químicas dos derivados propostos, a partir de moléculas de 1,4-naftoquinona e xantina, assim como seus respectivos códigos.

 <p style="text-align: center;"><b>D1</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>D2</b></p>	
 <p style="text-align: center;"><b>D4</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>D5</b></p>	 <p style="text-align: center;"><b>D6</b></p>

### 3.2 TRIAGEM VIRTUAL

Para a realização da ancoragem molecular, o *grid box* foi construído para a enzima de acordo com as dimensões dispostas no quadro 2, através dos resíduos de aminoácidos importantes do sítio catalítico.

Quadro 2. Valores do *grid box*

ENZIMA	CÓDIGO PDB	RESOLUÇÃO (Å)	TAMANHO DO GRID BOX	COORDENADAS DO GRID BOX	RESÍDUOS DE AMINOÁCIDOS
NSP 9	6W9Q	2.05	26×40×50	-2.787 x -20.031 x -6.518	Ser-105, Leu-9, Tyr-31, Leu-106, Pro-6, Ala-8, Met-101, Val-7, Leu-103, Ala-107

Até a presente data, ainda não foi obtido um inibidor específico para a enzima em questão, então para comparar e analisar dados, foi utilizado como padrão o fármaco remdesivir, que apresentou resultados interessantes contra SARS-CoV-2 em estudos *in silico*<sup>32</sup>. Os valores de energia de afinidade de ligação, tanto dos derivados naftoquinônicos, quanto do padrão e

das moléculas bases do melhor resultado (1,4-naftoquinona e xantina) estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Energia de interação (Kcal/mol) dos derivados D1 a D6 em comparação à um fármaco utilizado atualmente na terapia da covid-19 e a molécula de partida, o 1,4-naftoquinona.

Derivados	Energia de Ligação (Kcal/mol)	Ligações de Hidrogênio
1	-8	0
2	-7,9	0
3	-8	1
4	-7,1	0
5	-8,1	3
6	-7,8	3
Remdesivir	-6,6	4
1,4-Naftoquinona	-5,6	2
Xantina	-5,4	4

Tanto os derivados 5 como 6 obtiveram boas energias de ligação com o alvo e interagiram através de 3 ligações de hidrogênio e outras ligações hidrofóbicas. O derivado 6 foi proposto a partir do derivado 5 e suas semelhanças são notáveis, porém a alteração feita na carbonila do anel aumentou a energia de ligação, tornando assim o derivado 5 mais promissor para posteriores avaliações.

Os resultados se mostram distintos de Junior et al. (2021)<sup>15</sup> que avaliou *in silico* a ligação de derivados do lapachol ao Nsp9 Replicase do SARS-CoV-2. Os derivados se distanciavam visivelmente do sítio ativo indicado, além disso, o autor cita Ser35, Val37, Arg35 e Pro53 como os resíduos de aminoácidos que interagiram com seus derivados, com no máximo de duas ligações de hidrogênio, porém não foram encontrados relatos na literatura que pudessem confirmar que esses seriam aminoácidos importantes para a atividade da enzima.

É notável que nenhum dos derivados propostos nesse trabalho se ligou especificamente no sítio ativo da molécula, o que tem relação com a polaridade do alvo trabalhado. Na inspeção visual da interação dos derivados com a proteína, é percebido que o derivado não se encaixa completamente no bolso catalítico. Portanto, o derivado 5 precisa ser mais considerado futuramente em termos de modificação estrutural para melhorar a afinidade de ligação geral e especificidade com o alvo.



Como pode-se observar, a hibridação molecular, uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, é uma alternativa eficaz de arquitetar racionalmente estruturas moleculares de novos protótipos de fármacos. A nova molécula produzida passou a apresenta maior afinidade pela enzima que os compostos que lhe deram origem.

Figura 3. Interações das moléculas de partida com a Nsp9 Replicase visualizadas no Discovery Studio.

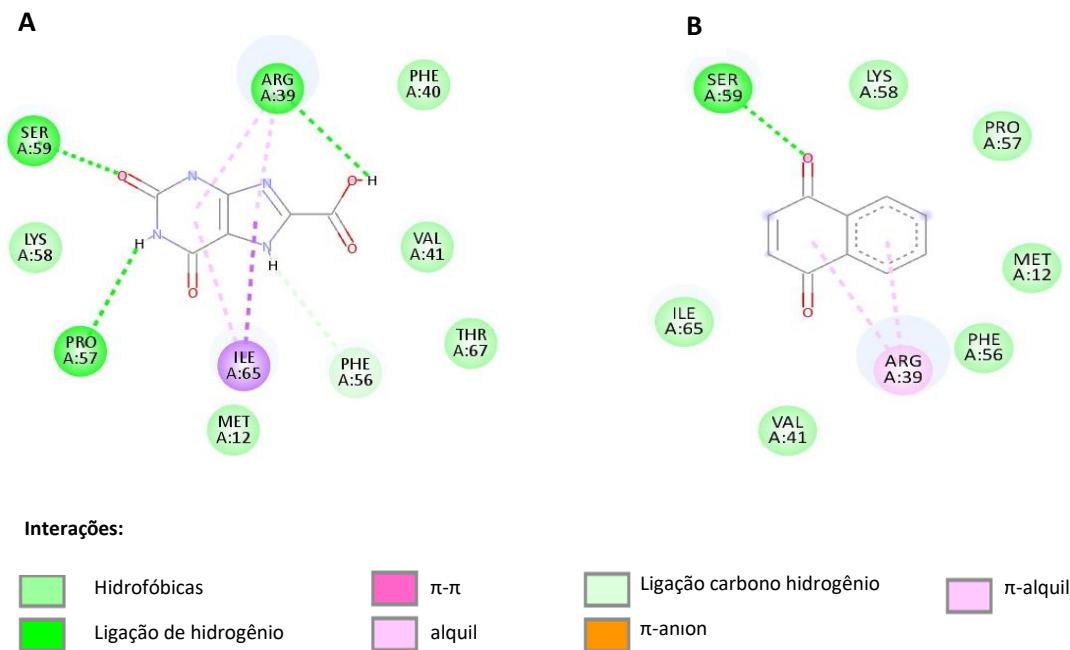
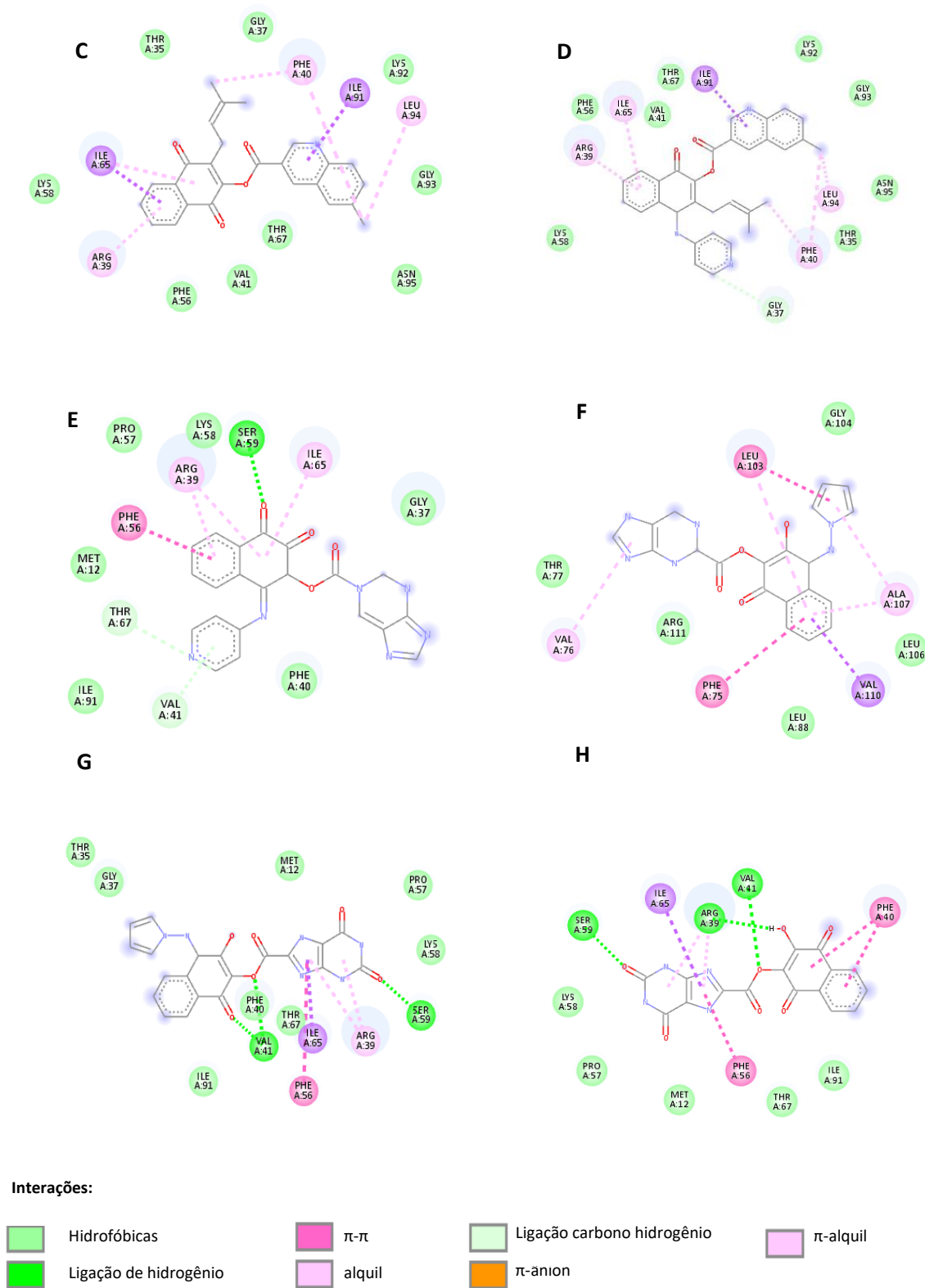


Figura 4. Interações das moléculas precursoras (A, B) e dos derivados D1, D2, D3, D4, D5 e D6 (C, D, E, F, H, G) com a Nsp9 Replicase visualizadas no Discovery Studio.



### 3.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A avaliação do perfil *druglikeness* é baseada principalmente na Regra de Lipinski, conhecida como a “regra dos cinco”, onde a absorção e/ou permeação de uma molécula candidata a fármaco são mais prováveis se cumprirem um ou mais das propriedades de: peso molecular < 500 Da, LogP < 5, doadores de ligação de hidrogênio < 5, ou aceitadores de ligação de hidrogênio < 10.<sup>25</sup> Desde a sua publicação, essa “regra dos cinco” tem sido considerada como parâmetro geral para avaliação de moléculas com boas solubilidades e permeabilidades e vem impulsionando o design racional de fármacos.<sup>26</sup> De acordo com o teste realizado no SwissADME®, a molécula selecionada foi avaliada como adequada, como demonstrado na tabela 2:

Tabela 2. Dados físico-químicos do derivado selecionado (D5).

Regra de Lipinski	
Peso Molecular (g/mol)	368,26 g/mol
Aceitadores H	8
Doadores H	4
LogP	2,85

## 4 CONCLUSÃO

Devido à escassez de tratamentos específicos para a infecção pelo SARS-CoV-2, as substâncias derivadas de produtos naturais surgem como uma alternativa para se obter um tratamento direcionado, visto que constituem uma fonte renovável de metabólitos especializados que podem ser utilizados para sintetizar uma molécula farmacologicamente ativas. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a molécula proposta pode ser um possível fármaco com ação na enzima Nsp9 Replicase do Sars-CoV-2, visto que apresentou boas interações com o receptor com aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima.

A hibridação molecular utilizada melhorou a afinidade da substância de partida pela enzima. Além disso, as etapas para a sua síntese são simples e podem ser realizadas com facilidade em qualquer laboratório de química orgânica, reduzindo, dessa maneira, custos para a sua possível produção. Contudo, sugere-se que novas modificações sejam investigadas tanto in silico quanto in vitro, visando otimizar as propriedades farmacodinâmicas do protótipo.

## REFERÊNCIAS

1. Bogoch, I.; Watts, A.; Thomas-Bachli, A.; Huber, C.; Kraemer, M.; Khan, K. *Journal of travel medicine* **2020**, 27, 2.
2. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W. *N Engl J Med* **2020**, 382, 727.
3. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, Tamin A, Harcourt JL, Thornburg NJ, Gerber SI, Lloyd-Smith JO, de Wit E, Munster VJ. *N Engl J Med* **2020**, 382, 1564–1567.
4. Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., Garry, R. F. *Nat. Med.* **2020**, 26, 450–453.
5. Zhang, C.; Chen, Y; Li, L.; Yang, Y.; He, J.; Chen, C.; Su, D. *Molecular Biomedicine* **2020**, 1, 1-5.
5. LITTLER, D. R., GULLY, B. S., COLSON, R. N., ROSSJOHN, J. *Iscience* **2020**,23, 101-258, 2020.
6. Frieman, M. et al. *Journal of Virology* **2012**, 86, 884-897.
7. Ponnusamy, R., Moll, R., Weimar, T., Mesters, J. R., Hilgenfeld, R. *Journal of Molecular Biology* **2008**, 1081.
8. Miknis, Z. J., Donaldson, E. F., Umland, T. C., Rimmer, R. A., Baric, R. S., Schultz, L. W. *Journal of Virology* **2009**, 83, 3007.
9. Jin, Z. et al. *Nature* **2020**, 1-7.
10. Barreiro, E. J.; Bolzani, V. S. *Quím. Nova* **2009**, 32, 2229-2236.
11. Atanasov, A. G. et al. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, 1-17.
12. Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 477.
13. Silva, D. G.; Emery, F. S. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, 54.
14. Mone, N.S.; Bhagwat, S.A.; Sharma, D.; Chaskar, M.; Patil, R.H.; Zamboni, P.; Nawani, N.N.; Satpute, S.K. *Coatings* **2021**, 11, 434.
15. Junior, N. N., Santos, I. A., Meireles, B. A., Nicolau, M., Lapa, I. R., Aguiar, R. S., Jardim, A., José, D. P. *Journal of biomolecular structure & dynamics* **2021**, 1–15.
16. ACD/ChemSketch. *Advanced Chemistry Development, Inc.*, Toronto, ON, Canada, 2021.
17. Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek and Geoffrey R Hutchison. *Journal of Cheminformatics* **2012**, 4,17.
18. Trott, O., & Olson, A. J. *Journal of computational chemistry*, 31, 455-461, 2010.

19. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. *J. Computational Chemistry* **2009**, 16, 2785-91.
20. BIOVIA, Dassault Systèmes, *BIOVIA Workbook, Release 2020; BIOVIA Pipeline Pilot, Release 2020*, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
21. Daina A, Michielin O, Zoete V. *Sci Rep.* **2017**,7, 42717.
22. Costa, T. S., Ornelas, D. L., Guimarães, P. I. C., & Merçon, F. *Química Nova na Escola* **2004**, 19, 36.
23. Kvasnica, M.; Urban, M.; Dickinson, N. J.; Sarek, J. *Natural product Reports* **2015**, 32, 1303-1330.
24. Tandon, V. K., Singh, R. V., Yadav, D. B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 14, 2901–2904.
25. Lipinski, C.A. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **2000**, 44, 235-249.
26. Machado, D., Girardini, M., Viveiros, M., Pieroni, M. *Frontiers in microbiology* **2018**, 9, 1367.