



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA

LAÍZA NEVES RODRIGUES

**AÇÃO INIBITÓRIA DE FLAVONÓIDES FRENTE A ENZIMA MPRO DO SARS-
COV2: ESTUDO DE DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR**

BELÉM, PA

2022

LAÍZA NEVES RODRIGUES

**AÇÃO INIBITÓRIA DE FLAVONÓIDES FRENTE A ENZIMA MPRO DO SARS-
COV2: ESTUDO DE DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Química, curso de Bacharelado em Química Industrial do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

**Orientador: Prof. Dr. Davi do Socorro Barros
Brasil**

Coorientador: Prof. Dr. Renato Araújo da Costa

BELÉM, PA

2022

**ACÇÃO INIBITÓRIA DE FLAVONÓIDES FRENTE A ENZIMA MPRO DO SARS-
COV2: ESTUDO DE DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR**

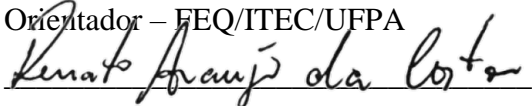
Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Química, curso de Bacharelado em Química Industrial do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Submetido à banca examinadora constituída por:



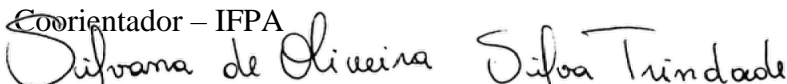
Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil

Orientador – FEQ/ITEC/UFPA



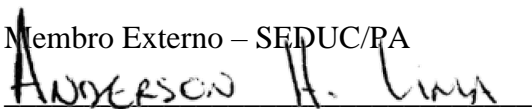
Prof. Dr. Renato Araújo da Costa

Coorientador – IFPA



Prof.ª Dra. Silvana de Oliveira Silva Trindade

Membro Externo – SEDUC/PA



Prof. Dr. Anderson Henrique Lima e Lima

Membro Interno – FAQUI/ICEN/UFPA

Julgado em: 22 / 02 / 2022

Conceito: E X C E L E N T E

BELÉM, PA

2022

*“A ti, Senhor, elevo minha alma.
Deus meu, em ti confio;”*

(Salmos 25:1-2)

*“Está tudo bem em chorar. Está tudo bem em fugir.
Apenas não desista.”*

(Jigoro Kuwajima)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis e me mostrar que tenho muita força.

Dedico este projeto ao meu amado pai, Paulo Antônio da Silva Nogueira, que mesmo não podendo estar ao meu lado durante esta jornada acadêmica, é minha principal influência e inspiração para realização desse sonho.

Agradeço a minha querida mãe, Normeiva Neves Rodrigues, que sempre priorizou minha educação mesmo que tivesse que se sacrificar em plantões duplos e noites em claro. Não importa o tamanho dos meus sonhos, o seu sorriso e fé inabalável me inspiram.

Às minhas avós, Normélia Cardoso Neves e Aldeniza Costa Rodrigues pelo brilho no olhar e o orgulho que sentem por mim.

Ao meu companheiro Matheus Miranda Duarte de Castro, que sempre acreditou no meu potencial, e me ajudou a superar as dificuldades, tanto acadêmicas quanto pessoais. Também o agradeço por cada abraço carinhoso e bom conselho que foram alguns dos pilares sobre os quais me sustentei.

À Mabel, por trazer alegria à minha vida todos os dias, e mesmo sem palavras me dizer tudo o que eu preciso ouvir.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes” (Isaac Newton). Tendo isso em mente, gostaria de agradecer de forma especial a todos os meus professores, que foram de fundamental importância na construção da minha vida profissional.

Ao professor Davi do Socorro Barros Brasil, por confiar em mim e me ceder seus conselhos e ensinamentos que foram essenciais para o desenvolvimento do TCC.

Ao professor Renato Araújo da Costa, pela sua generosidade e paciência ao responder às minhas dúvidas e me ajudar sempre que o solicitei.

RESUMO

A pandemia da COVID-19 (SARS-CoV-2) é uma emergência de saúde global. Diversas vacinas com alta eficácia foram desenvolvidas, mas o vírus, com certa rapidez, vem apresentando mutações que afetam suas características, como a transmissibilidade. A possibilidade de mutações que afetam a capacidade de proteção da vacina é algo alarmante. O presente estudo foi desenvolvido visando que diante desse cenário cada nova descoberta é bem-vinda, bem como a contribuição às pesquisas por fármacos de produtos naturais de origem nacional. Para tanto, técnicas aliadas ao planejamento de novos fármacos foram aplicadas, simulações de docagem molecular e dinâmica molecular utilizando a protease Mpro (principal protease do SARS-CoV-2) como alvo enzimático e ligantes flavonoides (classe de produtos naturais com atividade farmacológica antiviral relatada) selecionados de uma biblioteca de produtos naturais da biodiversidade brasileira. Resultados condizentes com a literatura foram encontrados, dois ligantes se destacaram tanto nas simulações de docagem quanto na dinâmica molecular, e foram sugeridos para etapas posteriores de planejamento de fármacos.

Palavras-chave: Docagem molecular, Dinâmica molecular, SARS-CoV-2, Mpro, Flavonoides.

ABSTRACT

The COVID-19 (SARS-CoV-2) pandemic is a global health emergency. Several highly effective vaccines have been developed, but the virus has been rapidly showing mutations that affect its characteristics, such as transmissibility. The possibility of mutations that affect the vaccine's ability to protect is somewhat alarming. The present study was developed in order that in this scenario, each new discovery is welcome, as well as the contribution to research for drugs of natural products of national origin. To this end, techniques allied to the design of new drugs were applied, molecular docking simulations and molecular dynamics using the protease Mpro (the main protease of SARS-CoV-2) as an enzymatic target and flavonoid ligands (class of natural products with reported antiviral pharmacological activity) selected from a library of natural products from Brazilian biodiversity. Results consistent with the literature were found, two ligands stood out both in docking simulations and in molecular dynamics and were suggested for later stages of drug design.

Keywords: Molecular docking, Molecular dynamics, SARS-CoV-2, Mpro, Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Distribuição do total de casos e B) óbitos por SARS-CoV-2 (COVID-19) entre os 20 países com maior número de casos.	14
Figura 2: A), B) e C) Imagens do coronavírus SARS-CoV-2.	15
Figura 3: Origens animais de coronavírus humanos.	18
Figura 4: Representação ilustrativa da transmissão e comparativo de tamanho da partícula de SARS-CoV-2.	19
Figura 5: A) Interação da SARS-CoV-2 com os receptores ACE-2 nos cílios das células epiteliais, B) vias aéreas superiores, representadas por uma barreira de muco que cobre as células epiteliais e secretoras.	19
Figura 6: A) As proteínas spike na superfície do coronavírus se ligam aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) na superfície da célula-alvo, B) a protease serina transmembranar tipo II (TMPRSS2) liga-se e cliva o receptor ACE-2. No processo, a proteína spike é ativada, C) O ACE-2 clivado e a proteína spike ativada facilitam a entrada viral. Expressão de TMPRSS2 aumenta a captação celular do coronavírus.	20
Figura 7: Fluxograma dos Métodos de Modelagem Molecular.	22
Figura 8: Ilustração do modelo simplificado chave-fechadura da atividade de enzimas.	23
Figura 9: Estrutura molecular comum aos flavonoides.	28
Figura 10: Esqueleto molecular básico de cada subclasse de flavonoide.	28
Figura 11: Estrutura cristalográfica em 3D da enzima Mpro do SARS-CoV-2, com sítio ativo destacado em verde.	31
Figura 12: Representação 3D em backbone da cadeia da enzima Mpro da SARS-CoV-2, com sítio ativo destacado em verde.	32
Figura 13: Representação da região do grid (campo destacado em verde) utilizado para a docagem molecular na enzima Mpro.	32
Figura 14: Representação em 3D da estrutura cristalina da enzima Mpro do SARS-CoV-2 em complexo com ligante cristalográfico no sítio ativo.	33
Figura 15: Representação em 2D dos compostos A) NuBBE_1317 (12,12-dimethyl-4-phenyl-3,11-dioxatricyclo[8.4.0.0 ^{2,7}]tetradeca-1(10),2(7),8,13-tetraen-6-one), B) NuBBE_2523 (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-6,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one), C) NuBBE_1878 (5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-2-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-4H-chromen-4-one), D) NuBBE_2222 (4-[3-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)propyl]-2-methoxyphenol) e E) NuBBE_2417 (4-[(3R)-7-hydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3-yl]-3-methoxy-6-(2-methylbut-3-en-2-yl)benzene-1,2-diol).	34

Figura 16: Mapa de interações do ligante A) NuBBE_1317, B) NuBBE_ 2523, C) NuBBE_1878, D) NuBBE_2222, E) NuBBE_2417 e F) 11b com os resíduos de aminoácidos da enzima Mpro do SARS-CoV-2.....	36
Figura 17: RMSDs da estrutura proteica (em preto) e inibidores (em vermelho) para A) 11b, B) NuBBE_2523 e C) NuBBE_1878.	39
Figura 18: RMSF em função do número de resíduos dos complexos.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de flavonoides e suas atividades farmacológicas.	29
Tabela 2: Resultados de docagem molecular obtidos com o software GOLD dos cinco flavonoides com melhores energia de afinidade.....	35
Tabela 3: Regra dos cinco (RO5) de Lipinski para o inibidor N3 e os 5 ligantes em destaque.	35

LISTA DE SIGLAS

Ala: Alanina

Arg: Argenina

Asn: Asparagina

Asp: Aspartato

Cys: Cisteina

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

Gly: Glicina

His: Histidina

Leu: Leucina

Met: Metionina

Phe: Fenilalanina

Pro: Prolina

Ser: Serina

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Considerações iniciais	13
1.2. Justificativa	15
1.3. Objetivos	17
1.3.1. Objetivo geral.....	17
1.3.2. Objetivos específicos	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1. SARS-CoV-2	17
2.1.1. Mecanismo de Replicação e a Enzima Protease Mpro	21
2.2. Modelagem molecular	22
2.2.1. Docagem molecular	23
2.2.2. Dinâmica molecular	24
2.3. Regra dos Cinco de Lipinsky	25
2.4. Banco de dados NuBBEDB	26
2.5. Flavonoides	27
3. METODOLOGIA	29
3.1. Simulação de Docagem Molecular	29
3.2. Simulação de Dinâmica Molecular.	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1. Simulações de dinâmica molecular	38
5. CONCLUSÃO	41
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO I – VALORES DE ENERGIA DE LIGAÇÃO DOS 204 FLAVONOIDES CONSIDERADOS NO ESTUDO	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

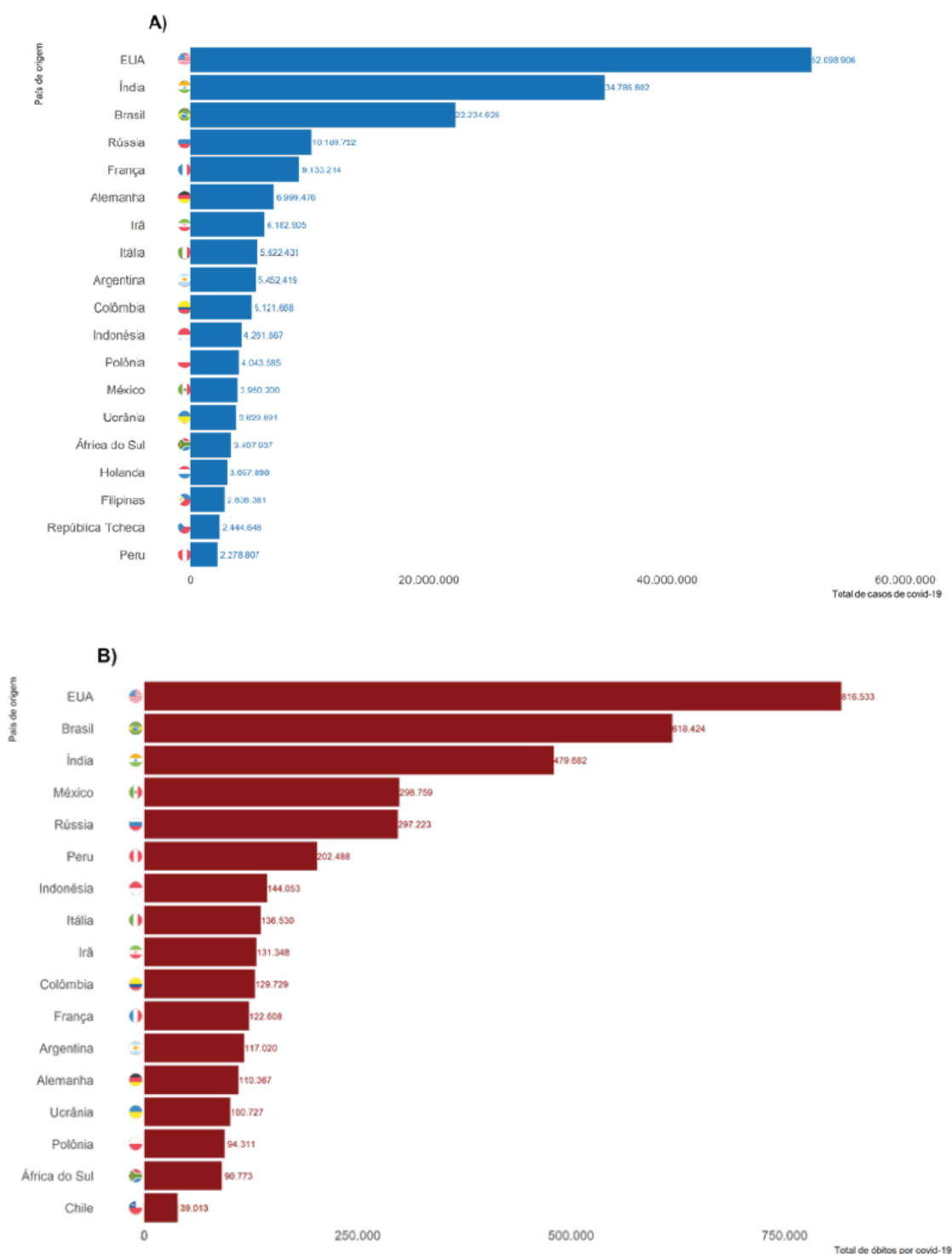
A pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) causada pela síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2 (SARS-CoV-2) é uma emergência de saúde global. Até o final da semana epidemiológica 51 de 2021, no dia 25 de dezembro de 2021, foram confirmados 276.436.619 casos de SARS-CoV-2 no mundo. Os Estados Unidos foi o país com o maior número de casos acumulados (52.098.906), seguido pela Índia (34.786.802), Brasil (22.234.626), Rússia (10.189.722) e França (9.133.214) (figura 1A). Em relação aos óbitos, foram confirmados 5.374.744 no mundo até o dia 25 de dezembro de 2021. Os Estados Unidos foram o país com maior número acumulado de óbitos (816.533), seguido do Brasil (618.424), Índia (479.682), México (298.759) e a Rússia (297.223) (figura 1B). (Ministério da saúde, 2021).

O coeficiente de incidência bruto no mundo ao final da semana 51 foi de 30.197,9 casos para cada 1 milhão de habitantes. Dentre os países com população acima de 1 milhão de habitantes, a maior incidência foi identificada na Geórgia (231.849,2 casos/1 milhão hab.), seguida pela República Tcheca (227.948,7/1 milhão hab.), Eslovênia (219.070,1/1 milhão hab.), Lituânia (189.880,4/1 milhão hab.), Sérvia (187.656,9/1 milhão hab.), Holanda (178.063,3/1 milhão hab.), Croácia (169.809/1 milhão hab.), Bahrein (159.880,3/1 milhão hab.), Estados Unidos (156.493,1/1 milhão hab.) e Israel (146.778,4/1 milhão hab.). (Ministério da saúde, 2021)

Em relação ao coeficiente de mortalidade (óbitos por 1 milhão de hab.), o mundo apresentou até o dia 25 de dezembro de 2021 uma taxa de 612,5 óbitos/1 milhão de habitantes. Dentre os países com população acima de 1 milhão de habitantes, o Peru apresentou o maior coeficiente (6.069,9/1 milhão hab.), seguido pela Bulgária (4.426,5/1 milhão hab.), Macedônia (3.790,3/1 milhão hab.), República Tcheca (3.328,1/1 milhão hab.), Croácia (3.008,3/1 milhão hab.) e Brasil (2.920,5/1 milhão hab.). (Ministério da saúde, 2021)

O COVID-19 é ainda associada, mesmo que temporariamente, a uma síndrome inflamatória multisistêmica pediátrica (SIM-P). É uma complicação da infecção pelo SARS-CoV-2 na população de zero a 19 anos, caracterizada por uma resposta inflamatória tardia e exacerbada que, em geral, acontece dias ou semanas após a contração do vírus. É uma síndrome rara, porém potencialmente grave e grande parte dos casos necessita de internação em unidade de terapia intensiva (UTI). (Organização Mundial da Saúde, 2020)

Figura 1: A) Distribuição do total de casos e B) óbitos por SARS-CoV-2 (COVID-19) entre os 20 países com maior número de casos.



Fonte: Adaptado de ROSER et al, 2021.

Apresenta amplo espectro clínico, com acometimento multissistêmico e os sintomas podem incluir: febre persistente, sintomas gastrointestinais, conjuntivite bilateral não purulenta, sinais de inflamação mucocutânea, além de envolvimento cardiovascular frequente. Os casos mais graves podem evoluir para óbito. Até 25 de dezembro de 2021,

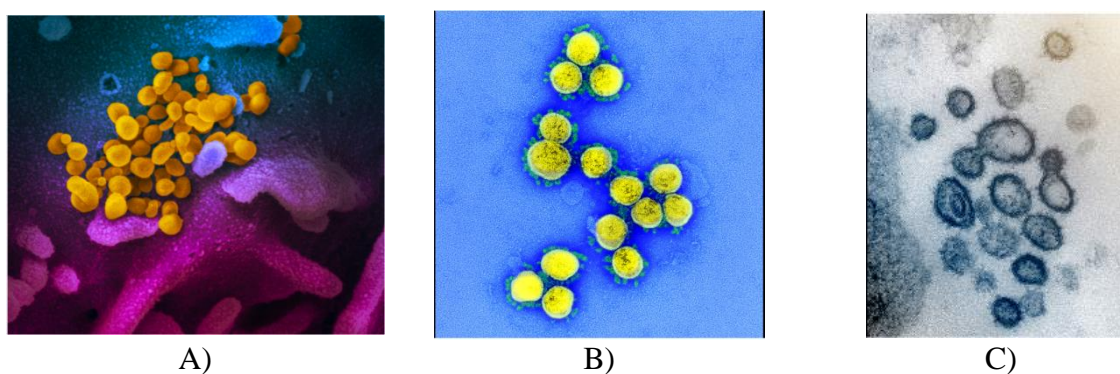
foram confirmados 1.434 casos de SIM-P no território nacional, e 86 evoluíram para óbito. (Organização Mundial da Saúde, 2020)

O Ministério da Saúde (MS) emitiu no dia 2 de fevereiro de 2021 a Nota Técnica sobre a variante do SARS-CoV-2 identificada no Brasil, a variante Gamma “*variants of concern*” (VOC). Até o momento existem cinco principais novas variantes do SARS-CoV-2 que estão sob vigilância dos países: a identificada no Reino Unido, variante Alpha, da África do Sul, a variante Beta, a variante Gamma, a identificada na Índia, variante Delta, e a variante Ômicron, da linhagem identificada na África do Sul. (Ministério da saúde, 2021)

Para a saúde pública, o sequenciamento genético do vírus SARS-CoV-2, aliado a outros estudos, possibilitam sugerir se as mutações identificadas podem influenciar potencialmente na patogenicidade, transmissibilidade, além de direcionar medidas terapêuticas, diagnósticas ou ainda contribuir no entendimento da resposta vacinal. Sendo assim, cada nova informação contribui para as ações de resposta a pandemia. (Organização Mundial da Saúde, 2021).

As figuras 2 A) e 2 B) foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Os pesquisadores colorizaram em amarelo o coronavírus de 2019. O vírus foi coletado de um paciente norte-americano e usado para infectar células cultivadas em laboratório. Ao fundo, em azul e roxo, o que se vê é a membrana de uma dessas células infectadas, figura 2 A). Os vírus estão emergindo da célula após utilizarem de sua maquinaria para se multiplicar, figura 2 C). (BORETTI et al, 2021)

Figura 2: A), B) e C) Imagens do coronavírus SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de BORETTI et al, 2021.

1.2. Justificativa

No caso da COVID-19, temos um cenário em que diversas vacinas com alta eficácia foram desenvolvidas em um curto espaço de tempo e têm sido aplicadas em milhões de pessoas. Por outro lado, o vírus vem apresentando capacidade de, com certa rapidez, sofrer mutações que afetam algumas das suas características, como a transmissibilidade. A

possibilidade de mutações que afetam a capacidade de proteção da vacina é possível, ainda que não tenha sido documentada de forma decisiva. Outra questão importante é a duração do efeito da vacina, que pode ter a sua efetividade reduzida ao longo de poucos meses. (PESCARINI et al, 2021).

Além disso, existe o fato de que as diversas vacinas são tecnologicamente diferentes, tendo diferentes efeitos sobre o sistema imunológico e conseqüentemente sobre sua eficácia (PESCARINI et al, 2021). Por fim, merece destaque a falta de claros marcadores de proteção para a COVID-19 (usualmente anticorpos mensuráveis que possam servir de marcadores de proteção) que, mesmo se encontrados, podem ser diferentes para as distintas vacinas. (PISHKO et al, 2021).

Diante desse cenário, é importante estar constantemente adquirindo conhecimentos acerca de novas formas de conter esse vírus, cada nova descoberta é bem-vinda. A metodologia de docagem molecular se encaixa muito bem nesse contexto, pois tem uma contribuição enorme na avaliação da interação entre pequenas moléculas e grandes biomoléculas. (RUDNITSKAYA et al, 2010).

Obtêm-se deste método, desde valores de interação e informações físico-químicas, até uma ilustração geométrica dessas formações complexas. Por conseguinte, a aplicação dessa ferramenta no planejamento de novos fármacos possibilita o desenvolvimento de moléculas bioativas úteis para tratamento das mais diversas doenças. (RUDNITSKAYA et al, 2010).

De acordo com Dai et al (2020) a protease Mpro do SARS-CoV-2 é um alvo ideal para o design de medicamentos antivirais devido à sua alta conservação entre diferentes cepas de coronavírus, Mpro Protease é a principal protease do coronavírus humano e, portanto, foi utilizada como alvo enzimático neste estudo.

A classe de produtos naturais flavonoides foi escolhida no presente trabalho por ter, segundo Santos et al (2021) e Coutinho et al (2009), diversas atividades farmacológicas, tais como, antiviral e antimicrobiana; estas funções devem-se, em geral, pela característica quelante dos flavonoides e pela interação e inibição de proteínas e enzimas biológicas responsáveis por algum processo celular presentes nas enfermidades citadas anteriormente.

A soma desses dados motiva a realização deste estudo, bem como a contribuição às pesquisas por fármacos de origem nacional.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo geral

Analisar as interações de produtos naturais da classe flavonoides com a enzima Mpro do SARS-CoV-2.

1.3.2. Objetivos específicos

- Aplicar a regra dos cinco de Lipinski nos flavonoides do banco de dados NuBBEDB
- Realizar simulações de docagem molecular
- Verificar as interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima Mpro com as moléculas mais bem pontuados na docagem molecular.
- Realizar simulações de dinâmica molecular

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. SARS-CoV-2

Conforme Zhou et al (2020) e Gorbalenya et al (2020), em novembro de 2019 pacientes começaram a apresentar vários graus de desconforto respiratório de etiologia desconhecida, e se tornou evidente que a maioria dos casos tinha um histórico compartilhado de exposição ao Mercado Atacadista de Frutos do Mar de Huanan (o chamado “mercado úmido”) na província de Wuhan na China.

No dia 9 de janeiro de 2020 Pesquisadores chineses compartilharam a sequência genética do novo betacoronavírus, (latim: *corona* = coroa) nomeados pelos picos (*spikes*) em forma de coroa em sua superfície, são vírus envelopados (apresentam camada externa lipoproteica carregada da membrana citoplasmática da célula hospedeira) tipo RNA fita única ou simples de sentido positivo que pertencem à família *Coronavirinae*. (RABI, et al, 2020). Existem quatro subgrupos principais - alfa, beta, gama e delta - baseados sobre sua estrutura genômica. (ZHOU et al, 2018).

Inicialmente chamado de 2019-nCov e posteriormente rebatizado, pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, como SARS-CoV-2. (ZHU et al, 2020).

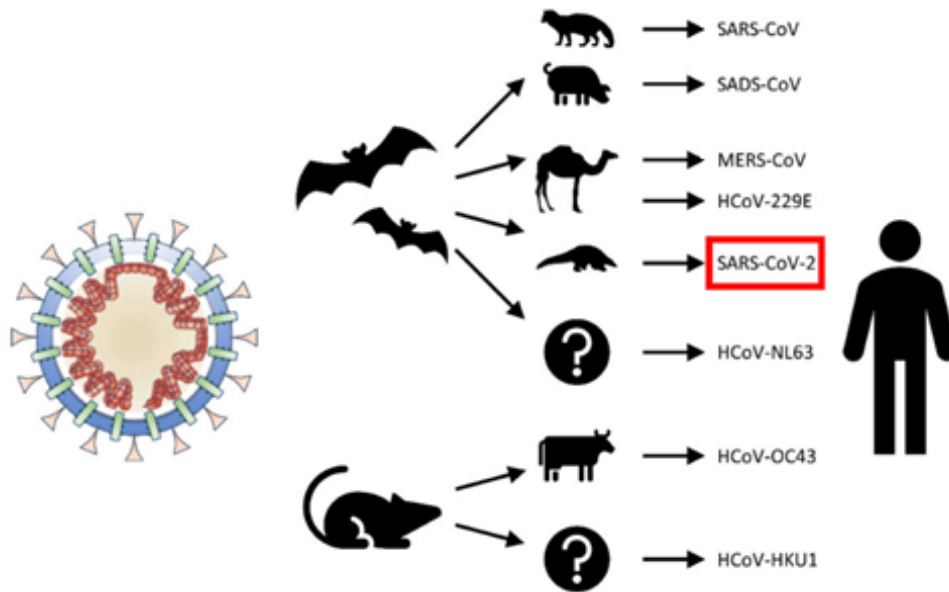
Os principais sintomas relatados são: febre, tosse e falta de ar, pneumonia clínica, insuficiência respiratória hipóxica necessitando de internação na UTI e ventilação mecânica. (HUANG et al, 2020).

SARS-CoV-2 parece ser uma versão mutante do seu vírus mais intimamente relacionado, RaTG13, amostrado de morcegos (*Rhinolophus a nis*). (ANDERSEN et al, 2020). Acredita-se que Pangolins malaios (*Manis javanica*; um mamífero comedor de

formigas de focinho comprido vendido ilegalmente por uso na medicina tradicional chinesa) seja o hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2 (figura 3). (CYRANOSKI, 2020).

A jornada do SARS-CoV-2 para infectar um hospedeiro começa quando o vírus é liberado no ambiente em gotículas à base de fluidos respiratórios contaminados. (RICHARD et al, 2020).

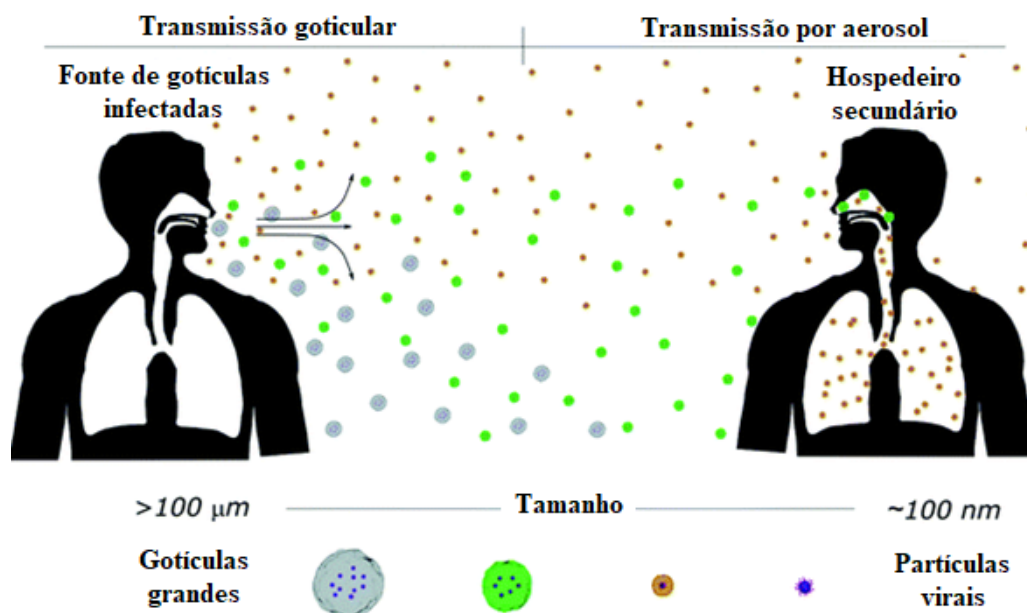
Figura 3: Origens animais de coronavírus humanos.



Fonte: Adaptado de RABI et al, 2020.

Gotículas maiores que 100 μm (chamadas gotículas balísticas) se depositam rapidamente e podem infectar diretamente uma pessoa dentro de sua via balística ou indiretamente através de superfícies contaminadas. Gotículas menores de aproximadamente 10 μm , por não sofrerem interferência significativa da força da gravidade, flutuam distâncias maiores aumentando o raio de contágio do vírus (figura 4). (WEBER et al, 2008; CUMMINS et al, 2020).

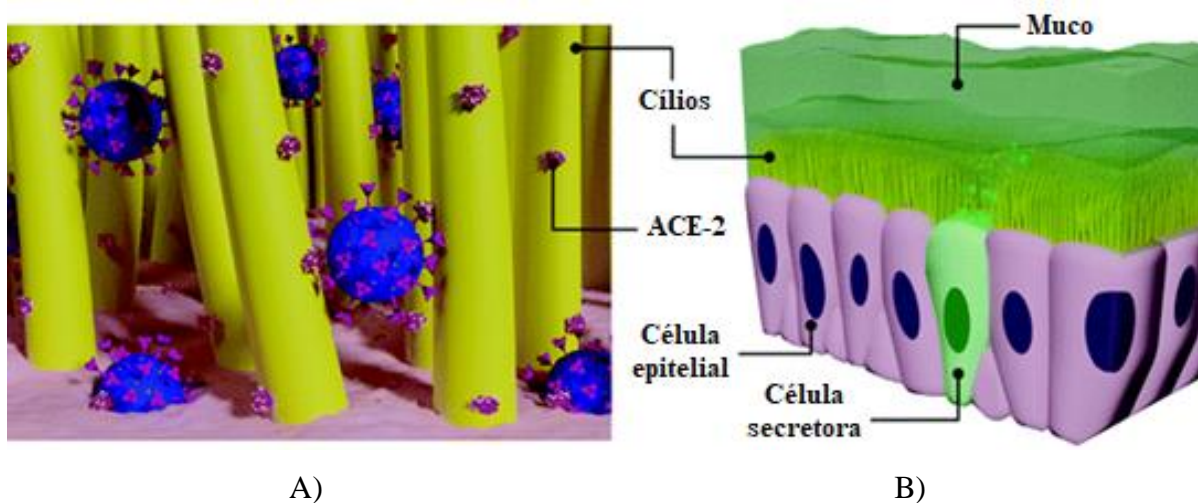
Figura 4: Representação ilustrativa da transmissão e comparativo de tamanho da partícula de SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de SILVEIRA et al, 2021.

As gotículas com vírus se instalam no nariz, onde o vírus precisa superar as interações intermoleculares e hidrofóbicas com a camada de muco (figura 5B). O muco atua como uma primeira barreira de defesa física e filtra partículas estranhas por afinidade e tamanho através de poros que favorecem a passagem em nanoescala de até 200 nm. Isso dá ao SARS-CoV-2 (tamanho de aproximadamente 100 nm de diâmetro) uma vantagem para atravessar a rede de hidrogel e infectar células epiteliais – ricas em receptores ACE-2 (figura 5A). (MA et al, 2021).

Figura 5: A) Interação da SARS-CoV-2 com os receptores ACE-2 nos cílios das células epiteliais, B) vias aéreas superiores, representadas por uma barreira de muco que cobre as células epiteliais e secretoras.



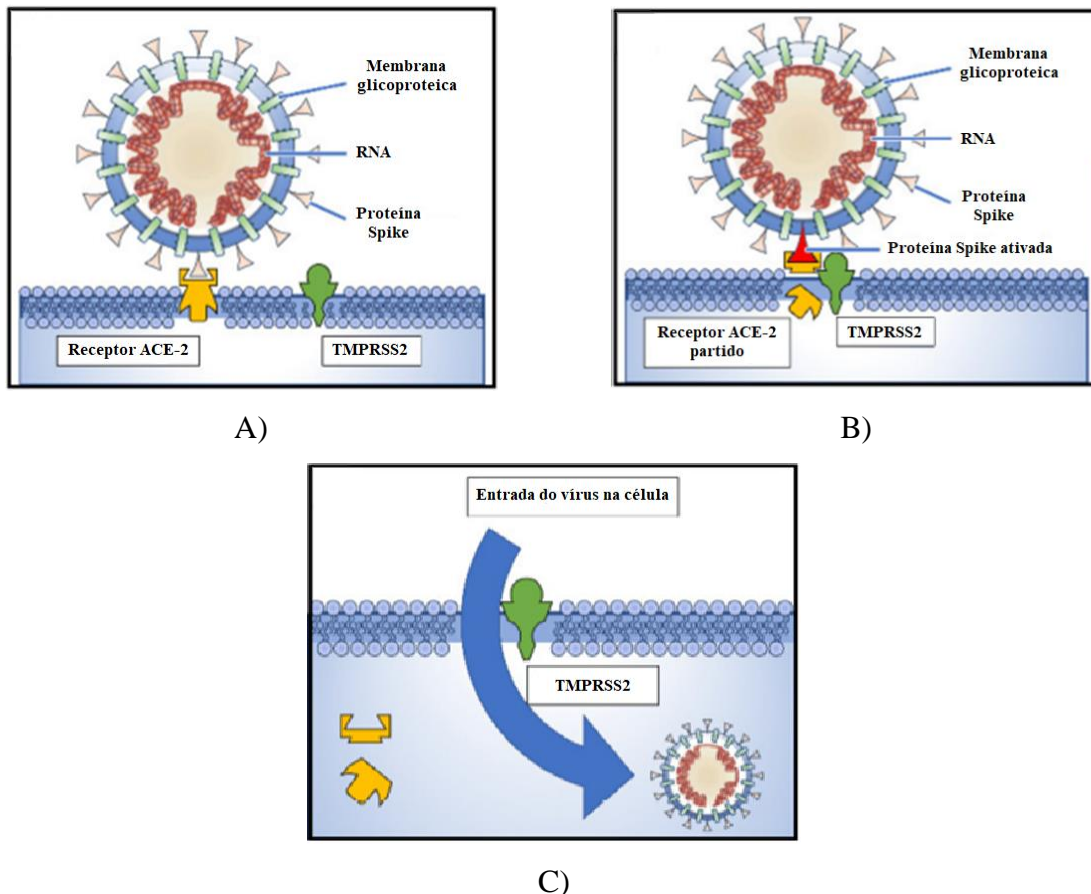
Fonte: Adaptado de SILVEIRA et al, 2021.

Após a infecção, o vírus inicia um ciclo constante de replicação e liberação de novas partículas virais, que podem ser expelidas para o ambiente ou infectar outras células ao longo do trato respiratório. (GEISER et al, 2010).

O *spike* (um antireceptor de ACE-2) é uma glicoproteína S que tem 2 domínios S1 que reconhece o receptor celular da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2), e o domínio S2 que é responsável pela fusão do vírus com a célula hospedeira. O vírus entra na célula através da ligação específica entre sua proteína *spike* e o receptor ACE-2 (figura 6) (especialmente abundante nos cílios nas células epiteliais da mucosa nasal) complexados. (HOFFMANN et al, 2020).

O complexo é alvo da enzima (serina protease transmembranar de tipo 2) TMPRSS2. Essa protease cliva o complexo na altura do receptor ACE-2 e ativa o segundo domínio da proteína *spike*. Uma vez completa essa etapa, inicia-se a fusão do vírus com a membrana da célula, então o nucleocapsídeo do vírus é descartado e o genoma do vírus adentra a célula, como é demonstrado na figura 6. (RABI et al, 2020).

Figura 6: A) As proteínas spike na superfície do coronavírus se ligam aos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) na superfície da célula-alvo, B) a protease serina transmembranar tipo II (TMPRSS2) liga-se e cliva o receptor ACE-2. No processo, a proteína spike é ativada, C) O ACE-2 clivado e a proteína spike ativada facilitam a entrada viral. Expressão de TMPRSS2 aumenta a captação celular do coronavírus.



Fonte: Adaptado de RABI et al, 2020.

2.1.1. Mecanismo de Replicação e a Enzima Protease Mpro

De forma simplificada, Chen et al (2020) explica que após a entrada do vírus na célula começa o processo de replicação (produção de proteínas virais estruturais e cópias do ácido nucleico original) para que novos *virions* possam se formar. Os vírus são parasitas intracelulares, ou seja, não têm capacidade de se replicar sozinhos, precisam do maquinário de uma célula hospedeira.

O fato de a polaridade do genoma viral ser positiva significa que ele pode ser utilizado pelo maquinário da célula e produzir proteínas (tradução direta) sem a necessidade de passar por outras etapas de produção proteica.

O RNA ribossomal da própria célula faz a leitura desse RNA mensageiro do vírus, leem os peptídeos pp1a e pp1ab (CHEN et al, 2020). De acordo com Dai et al (2020) cerca de dois terços do comprimento do genoma, traduz diretamente duas poli-proteínas, pp1a e pp1ab. Essas poliproteínas são processadas por uma protease principal do SARS-CoC-2, Mpro e por uma protease semelhante a papaína, em 16 proteínas não estruturais (NSPs). Esses NSPs se envolvem na produção de RNAs subgenômicos que codificam quatro proteínas estruturais principais (proteínas de envelope (E), membrana (M), spike (S) e nucleocapsídeo (N)) e outras proteínas acessórias. Portanto, essas proteases, especialmente Mpro, desempenham um papel crucial no ciclo de vida dos coronavírus. Mpro é uma protease de três domínios (domínios I a III) envolvida na maioria dos eventos de clivagem de maturação dentro da poliproteína precursora. Mpro é um homodímero contendo dois protômeros, apresenta uma díade Cys-His localizada na fenda entre os domínios I e II. Como o Mpro não possui homólogo humano, é um alvo antiviral ideal.

De acordo com Goyal et al (2020), Jin et al (2020) e Zhang et al (2020), a Mpro é uma enzima crítica para o ciclo de vida do vírus. Sua atividade produz proteínas não estruturais que são cruciais para a replicação do genoma e produção de *virions* de coronavírus. A maturação (reunião da cápside e do ácido nucleico, formando o nucleocapsídeo, que é então circundado pelo envelope em um mecanismo de liberação) do SARS-Cov2 depende de duas proteases virais: Mpro (protease principal) e PLpro (protease semelhante à papaína). O SARS-CoV Mpro existe como um homodímero e cada protômero tem um sítio ativo. A protease Mpro é um alvo ideal para o design de medicamentos antivirais devido à sua alta conservação entre diferentes cepas de coronavírus, Mpro Protease é a principal protease do coronavírus humano SARS-CoV-2.

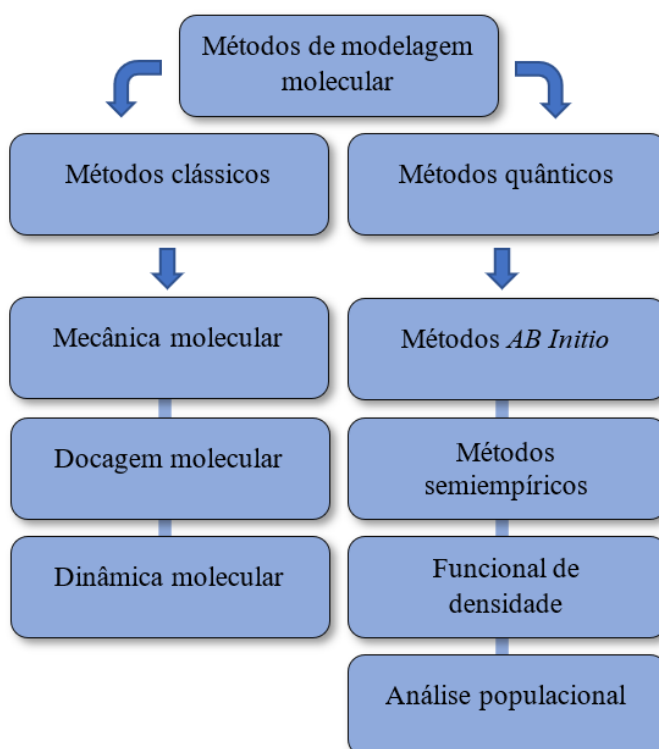
2.2. Modelagem molecular

De acordo com Barreiro et al (1997), a modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas para a construção, edição e visualização, análise e armazenamento de sistemas moleculares complexos. Estas ferramentas têm sido de grande valia, portanto, para a interpretação e elaboração de sistemas de interação molecular.

O desenvolvimento de métodos de cálculos, cada vez mais eficazes para o estudo de diferentes sistemas moleculares, vêm sendo explorado. Isto deve-se em função de que, para cada estudo em questão, existe um método que se adequa melhor. (GONÇALVES, 2005).

Conforme exposto por Barreiro et al (1997) e Milne et al (1993), os modelos computacionais, utilizados na modelagem molecular, são classificados quanto ao seu formalismo teórico em dois tipos: métodos clássicos e métodos quânticos. Os métodos clássicos são baseados na mecânica clássica newtoniana e são subdivididos em três grupos: mecânica molecular, docagem molecular e dinâmica molecular. Por outro lado, os métodos quânticos fundamentam-se na mecânica quântica e, portanto, na interpretação do comportamento ondulatório dos elétrons e núcleos, discorrido por Schrödinger. Esta aproximação quântica abrange uma quantidade maior de modelos, a citar: métodos *AB initio*, métodos semiempíricos, funcional de densidade e análise populacional. O fluxograma abaixo (Figura 7) ilustra esta divisão entre os métodos de modelagem molecular.

Figura 7: Fluxograma dos Métodos de Modelagem Molecular.



Fonte: Autoria própria.

Faz-se relevante frisar que, para Barreiro et al (1997), de Sant'anna et al (1996) e Milne et al (1993) na escolha do modelo computacional para o estudo, deve-se ter em mente a precisão necessária dos resultados, as propriedades que se deseja obter e a configuração da máquina utilizada, uma vez que sistemas moleculares mais complexos demandam uma grande capacidade de processamento computacional frente aos cálculos a que estes se estabelecem.

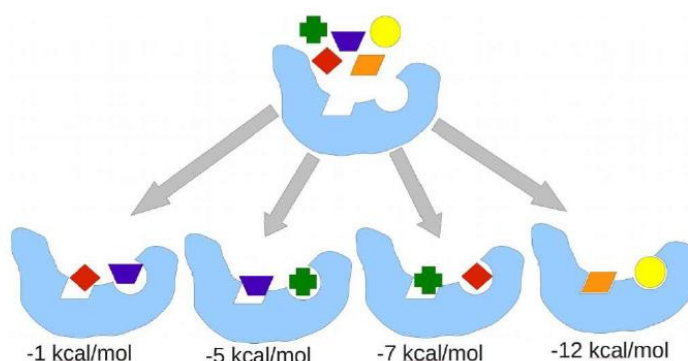
2.2.1. Docagem molecular

A docagem molecular é um método utilizado para prever o modo de ligação de pequenas moléculas na cavidade de interação de macromoléculas, sendo capaz de determinar as mudanças de conformação do ligante por meio de interação no alvo de maneira a formar um complexo receptor-ligante. O processo de docagem compreende duas etapas principais: o algoritmo de busca e a função de pontuação, que estão relacionadas à predição do posicionamento (conformação e orientação) no interior do alvo molecular, além de avaliação da afinidade de ligação. Esta técnica é comumente empregada para selecionar estruturas promissoras para a avaliação experimental por meio de procedimento de uma triagem virtual. (SANTOS et al, 2013).

Conhecida outrora como ancoramento molecular ou atracamento molecular, a docagem molecular (do inglês: *molecular docking*) surgiu como um método de análise da interação intermolecular, entre uma molécula receptora e uma molécula ligante. Em geral, as moléculas receptoras são enzimas ou proteínas biológicas, com as quais uma molécula menor interagirá e as moléculas ligantes são compostos, cuja escolha é baseada na intenção de prever alguma atividade com sítios das biomoléculas anteriores. (PIETRALONGA et al, 2015).

A princípio, a docagem consistia em uma interação do tipo chave-fechadura (Figura 8), onde as macromoléculas representavam as fechaduras e os ligantes representavam as chaves, e ambas se ligam por meio de resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da macromolécula. (PIETRALONGA et al, 2015).

Figura 8: Ilustração do modelo simplificado chave-fechadura da atividade de enzimas.



Fonte: PIETRALONGA et al, 2015.

Com o passar dos anos e devido à evolução dos métodos computacionais, pôde-se chegar a simulações mais complexas, nas quais ligantes e receptores possuem flexibilidade. Este progresso tornou possível a simulação de sistemas moleculares biológicos com maior confiabilidade. (PIETRALONGA et al, 2015).

Assim, a docagem molecular tornou-se uma ferramenta revolucionária no planejamento de fármacos, uma vez que, entre outros pontos, a inibição enzimática constitui um dos mecanismos de ação mais importantes dos fármacos. A análise dos resultados de docagem molecular consiste na interpretação do valor de energia de *docking* ($E_{docking}$), como mostra a equação 1 abaixo. Este valor resulta da soma das energias de interação receptor-ligante (E_{inter}), provenientes das interações eletrostáticas e de Van Der Waals, com as energias intramoleculares (E_{intra}), provenientes dos graus de liberdade da molécula ligante. (PIETRALONGA et al, 2015).

$$E_{docking} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

2.2.2. Dinâmica molecular

De acordo com Namba et al (2008) a simulação de Dinâmica Molecular (DM) é uma das técnicas computacionais mais versáteis usada em Química Medicinal para o estudo de macromoléculas biológicas. No planejamento racional de fármacos baseado em estrutura, as simulações de DM têm contribuído exaustivamente em diversos estágios do processo. A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da mecânica clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema. Para se obter as propriedades macroscópicas de interesse a aplicação da mecânica estatística é requerida, a qual tem a função de calcular propriedades observáveis macroscópicas (pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia, energia livre etc.), a partir de outras microscópicas.

Com base na Mecânica Molecular (MM), as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas é referido como “campo de força”. O campo de força empírico, permite que a energia potencial total do sistema, $V(r)$, seja calculada como a partir da estrutura tridimensional (3D) do sistema. $V(r)$ é descrito como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb).

A confiabilidade dos resultados é baseada na elaboração de um campo de força com parâmetros bem definidos. A escolha do campo de força depende, em grande parte, do sistema a ser estudado e das propriedades que serão investigadas. No caso de sistemas biomoleculares, campos de força comuns são CHARMM, AMBER, entre outros

Para se realizar uma simulação de DM é importante especificar as posições iniciais das partículas que constituem o sistema. É conveniente situar inicialmente as partículas nas posições de uma rede cristalina, o que evita sobreposição indesejada entre elas, gerando uma caixa de simulação que pode adotar diferentes geometrias. É comprovado que os resultados das simulações são praticamente independentes do tipo de geometria utilizada para as caixas de simulação. As mais comumente usadas são a cúbica, a paralelepípedica e a octaédrica truncada. Antes de se iniciar as simulações de DM, o sistema deve ser minimizado para eliminar maus contatos entre os átomos. A minimização de energia, também conhecida como otimização da geometria, é uma técnica que visa encontrar um conjunto de coordenadas que minimizam a energia potencial do sistema de interesse. O sistema minimizado possui forças pequenas sobre cada átomo e serve, portanto, como estrutura de partida para iniciar as simulações de DM.

Após a minimização de energia do sistema, este é gradualmente aquecido para a temperatura de interesse T_0 , atribuindo as velocidades iniciais de todas as partículas.

Após a etapa chamada de inicialização, onde se alcança o equilíbrio termodinâmico, pode-se então gerar as trajetórias da DM e calcular as diferentes propriedades para o sistema de interesse.

As mudanças conformacionais de proteína observadas durante as simulações de DM são descritas através dos desvios quadráticos médios (RMSD) e as flutuações de estrutura média das proteínas são expressas em termos de flutuações dos desvios quadráticos médios atômicos (RMSF).

2.3. Regra dos Cinco de Lipinsky

Durante o desenvolvimento de fármacos o “*Lead compound*” (molécula com atividade farmacológica promissora que necessita de melhoramento) independentemente de sua origem, a maioria precisa ser melhorada através de modificações químicas até adquirirem propriedades farmacológicas aceitáveis, tais como: maior potência e seletividade, e menor toxicidade. (SANTOS et al, 2018).

No decorrer do processo de melhoramento de uma droga através de modificações químicas, muitas vezes, algumas características físico-químicas são drasticamente alteradas,

gerando um comportamento farmacocinético indesejado, fato inclusive que pode tornar a droga inapropriada para administração por via oral. (MANLY et al, 2008).

Christopher A. Lipinski e colaboradores realizaram um estudo com mais de 2000 fármacos, no qual observaram que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral. (LIPINSKI, 2004).

Os resultados alcançados pelo estudo geraram a chamada regra dos cinco de Lipinski. Tal regra tem o intuito de auxiliar os químicos medicinais nas decisões relacionadas às modificações químicas e, assim, reduzir o número de compostos preparados com propriedades físico-químicas indesejadas. De acordo com as regras de Lipinski são propriedades moleculares relevantes: o log P, o número de doadores de ligações de hidrogênio, o número de aceptores de ligações de hidrogênio, o peso molecular, bem como, os pontos de interação para os principais alvos de fármacos, como os ligantes de receptores acoplados à proteína G, inibidores de cinases, moduladores de canais iônicos e receptores nucleares. (LIPINSKI et al, 2001).

A regra propõe que a má absorção ou permeação é mais provável quando a molécula possui mais que 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais que 10 aceptores de ligação de hidrogênio, peso molecular maior do que 500 daltons e log P calculado (Clog P) maior do que 5, sendo todos os parâmetros múltiplos de cinco. (LIPINSKI et al, 2001).

Considerando a relevância da disponibilidade das drogas durante os ensaios clínicos, bem como as vantagens da via oral para a administração de fármacos, é muito importante que durante o desenvolvimento de novas moléculas bioativas, seja verificado se a regra dos 5 de Lipinski está sendo seguida ou violada em algum parâmetro. (VEBER et al, 2002).

2.4. Banco de dados NuBBEDB

Para desvendar a química dos produtos naturais brasileiros, os Núcleos de Bioensaios NuBBEDB (do inglês Nuclei of Bioassays, Ecophysiology and Biosynthesis of Natural Products Database) que significa Banco de Dados de Ecofisiologia e Biossíntese de Produtos Naturais, foi criado como a primeira biblioteca de produtos naturais da biodiversidade brasileira. (PILON et al, 2017).

O conteúdo do NuBBEDB é de livre acesso online e fornece informações multidisciplinares validadas, descrições químicas, espécies, fontes, localizações geográficas, dados espectroscópicos (RMN) e propriedades farmacológicas. Também é relatada a distribuição de produtos naturais dentro dos biomas brasileiros, a relação entre essa

distribuição com a ocorrência de espécies e a associação de atividades biológicas. O NuBBEDB está em contínuo desenvolvimento para se manter um banco de dados completo da química brasileira de produtos naturais. (PILON et al, 2017).

Desde o último lançamento em 2013, a estrutura computacional foi aprimorada e hoje consta com muitos atributos informacionais como: a estrutura da imagem 2D, nome IUPAC, massa monoisotópica, massa molecular, volume molecular, números de doadores e aceptadores de ligações de hidrogênio, coeficiente de partição de água (cLogP), número de ligações rotativas (nRotb), área de superfície polar topológica (TPSA), número de violações da regra de 5 de Lipinski, estrutura química 3D (arquivos de formato .MOL2 e .MOL) e espectros de ¹H e ¹³C NMR. (PILON et al, 2017).

Dos 2.147 compostos no NuBBEDB, 1.688 foram isolados de plantas (78%), 325 são produtos semissintéticos(15%), 109 foram obtidos a partir de microrganismos (5%), 34 são produtos de biotransformação (1,6%) e 8 são do ambiente marinho (0,2%). (PILON et al, 2017).

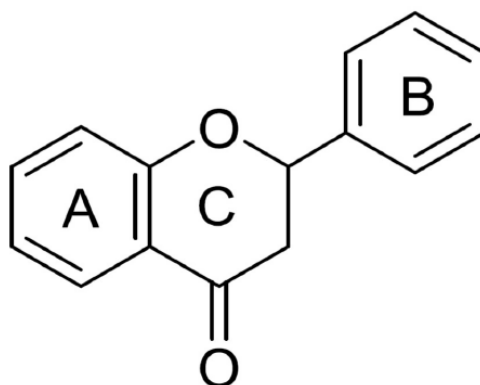
2.5. Flavonoides

Os flavonoides representam uma classe de compostos naturais presentes em abundância no reino vegetal. São responsáveis por desde características físicas até funções biológicas. Além do seu valor para este reino, sua relevância estende-se aos humanos, uma vez que, ao longo dos anos, têm-se observado que estas moléculas podem desempenhar papel de fármacos no tratamento de diferentes tipos de enfermidades que acometem o organismo do ser humano. (SANTOS et al, 2021).

Nas plantas em geral, os flavonoides desempenham funções de proteção contra vírus, bactérias, fungos, insetos, e, até mesmo, radiação na faixa do UV. São responsáveis, também, pela coloração de algumas espécies de plantas e pela atração de animais polinizadores. (CARTAYA et al, 2001).

Segundo Cartaya et al (2001), suas moléculas possuem semelhanças estruturais, pois baseiam-se em uma estrutura comum entre eles, como mostrado na Figura 9. Em geral, apresentam dois anéis benzênicos conectados entre si, através de uma cadeia intermediária contendo o oxigênio como heteroátomo.

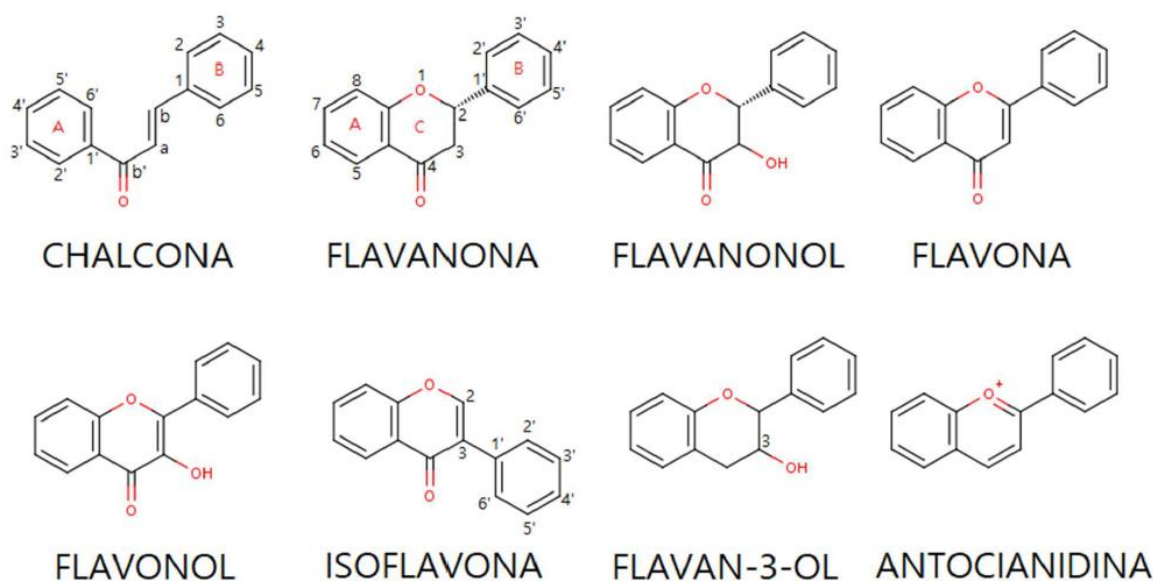
Figura 9: Estrutura molecular comum aos flavonoides.



Fonte: SANTOS et al, 2021.

De acordo com Santos et al (2021) e Coutinho et al (2009), dentro da classe dos compostos flavonoides, ocorre a divisão destes em subclasses (Figura 10). Estas, por sua vez, apresentam variações do esqueleto básico dos flavonoides, o que confere atividades distintas entre eles.

Figura 10: Esqueleto molecular básico de cada subclasse de flavonoide.



Fonte: COUTINHO et al, 2009.

Segundo Santos et al (2021) e Coutinho et al (2009), sabe-se, hoje, que estes compostos apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como (Tabela 1), atividade antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral. Estas funções devem-se, em geral, pela característica quelante dos flavonoides e pela interação e inibição de proteínas e enzimas biológicas responsáveis por algum processo celular presentes nas enfermidades citadas anteriormente.

Tabela 1: Exemplos de flavonoides e suas atividades farmacológicas.

Flavonoide	Classe	Atividade
Acacetina	Flavona	Antiviral
Amentoflavona		
Buteina	Chalcona	Anti-inflamatória
Hesperidina	Flavanona	Antioxidante
Naringenina		
Quercetina	Flavonol	Antitumoral Anti-inflamatória Antimicrobiana Antioxidante
Rutina	Flavona	Antitumoral Anti-inflamatória Antimicrobiana Antioxidante

Fonte: Adaptado de Santos et al, 2021.

3. METODOLOGIA

3.1. Simulação de Docagem Molecular

As estruturas dos produtos naturais (PNs) utilizados nesse estudo foram retirados do banco de dados de produtos naturais da biodiversidade brasileira (NuBBEDB). O NuBBEDB possui um total de 288 flavonoides, primeiramente, passaram pela pré filtragem de acordo com Regra dos cinco (RO5) de Lipinski et al. (1997) do próprio banco de dados, para facilitar a prospecção de moléculas promissoras a fármacos. Selecionando as moléculas que foram utilizados nas etapas posteriores de docagem molecular e dinâmica molecular.

Após a etapa anterior 204 flavonoides foram submetidos para o estudo de docagem molecular. A estrutura cristalina da protease principal (Mpro) do COVID-19 em complexo com um inibidor 11b foi recuperado do Protein Data Bank com o código PDB 6M0K (DAI et al, 2020). Para realizar as simulações de docagem molecular, foi utilizado o programa CSDGOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) (JONES et al, 1997), as grades de docking com 12 Å de raios foram posicionadas no sítio de ligação da Mpro tendo como referência o ligante cristalográfico 11b. Para o protocolo CSDGOLD, definiu-se os seguintes parâmetros para o algoritmo ChemPLP: todas as moléculas de água e o ligante cristalográfico 11b foram removidas. O programa CSDGOLD utiliza a função de aptidão empírica chamada ChemPLP, que consiste na aplicação de termos de ligação hidrogênio e

metal e potencial linear por partes (PLP) para modelar a complementaridade estérica entre a proteína e o ligante. Resolução de grade de 0,3 Å, região do sítio ativo da enzima foi definida como uma região esférica de 12 Å (*grid*), X = -10.74, Y = 15.76 e Z = 68.27, com volume de 119,296 Å³. A escala de pontuação adimensional mede o sucesso da pose; pontuações mais altas indicam melhores posições de alinhamento.

As cinco moléculas mais bem pontuadas foram selecionadas e submetidas no servidor PLIP (Protein Ligand Interaction Profiler) (SEBASTIAN et al, 2015) para análises das suas interações com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima Mpro. O Inibidor 11b também foi submetido ao servidor e obteve-se o seu mapa de interações com a Mpro a título de comparação de resultados.

3.2. Simulação de Dinâmica Molecular.

Após as análises das interações com resíduos de aminoácidos do sítio ativo da Mpro os cinco ligantes mais bem pontuados, bem como o ligante cristalográfico 11b, foram submetidos à simulação de dinâmica molecular (MD) para monitorar o comportamento dos sistemas em função do tempo (WERNER et al, 2012).

Para analisar as mudanças conformacionais das estruturas de proteínas e ligantes, bem como a estabilidade dos complexos ligante-receptor, realizamos simulações de DM na unidade de processamento gráfico (GPU) em Amber18 (LEE et al 2018). Para cada complexo, o campo de força AMBERff14SB (MAIER et al, 2015) e o campo de força geral AMBER (GAFF2) (WANG et al, 2004) foram usados para a proteína e o ligante, respectivamente. As cargas de potencial eletrostático restrito (RESP) para os ligantes foram calculadas no nível de teoria HF/6-31G(d) usando o programa Gaussian 09 (GAUSSIAN09, 2009). Os sistemas foram solvatados em uma caixa d'água octaédrica com o modelo de solvatação explícito TIP3P usado a uma distância de 12,0 Å entre os limites da caixa e os átomos de soluto mais próximos. Os sistemas solvatados foram subsequentemente neutralizados com adição de íons Na⁺. Assim, os sistemas foram preparados para simulação DM posterior.

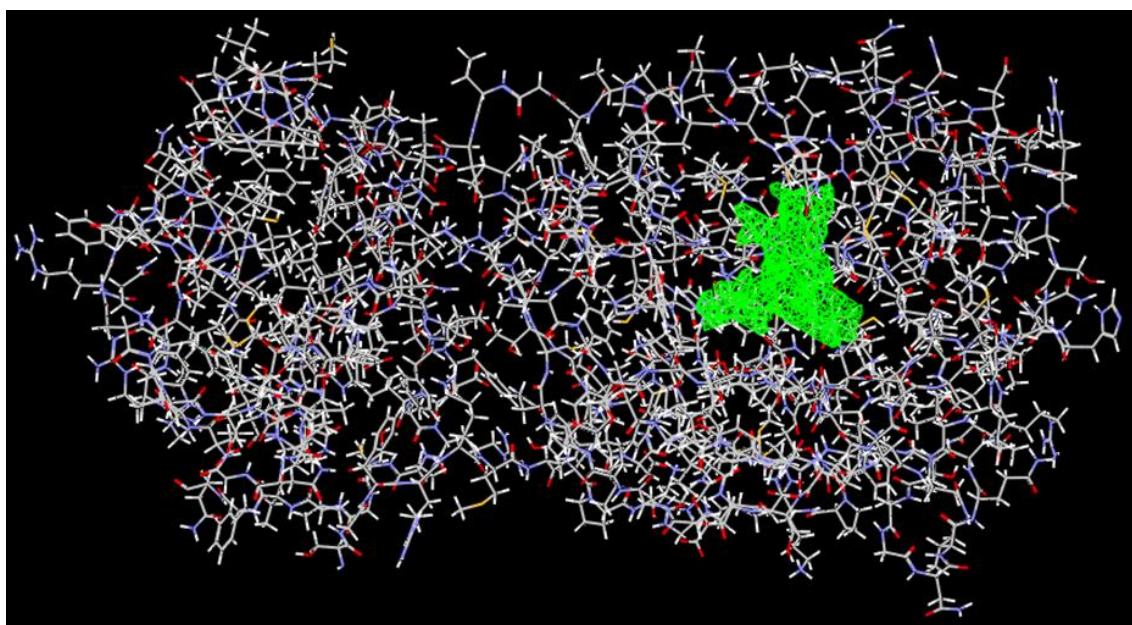
Para eliminar os choques estéricos, cada sistema foi submetido a quatro etapas de minimização. Primeiramente todos os íons e as moléculas de água foram minimizados com 2000 ciclos de *steepest descente*, seguidos de 3000 ciclos de *conjugate gradient algorithm*. Em seguida todos os átomos de hidrogênio foram minimizados por 2.000 ciclos de *steepest descent*, seguidos por 3.000 ciclos de *conjugate gradient algorithm*. As posições das moléculas de água e todos os hidrogênios foram relaxadas usando o mesmo protocolo. Todo o sistema foi minimizado em energia para 5000 ciclos de *steepest descent* e 5000 *conjugate gradient algorithm*.

Em seguida, iniciou-se o aquecimento do sistema de 0 a 300 K executando 200 ps de DM e 300 ps de equilíbrio de densidade com restrições de posição nos átomos proteína-ligante em volume constante. Antes de realizar a etapa de produção, todos os sistemas proteína-ligante foram equilibrados com 500 ps de DM sem restrições posicionais a uma pressão constante. A temperatura foi mantida em 300 K por acoplamento a um termostato Langevin usando uma frequência de colisão de 2ps^{-1} . Um corte de 10 \AA foi empregado para interações não ligadas, o método Particle Mesh Ewald (PME) (DARDEN et al, 1993) e o algoritmo SHAKE (RYCKAERT et al, 1977) foi usado para restringir os comprimentos de ligação envolvendo os átomos de hidrogênio. 100 ns de simulações de DM (produção) foram realizadas a uma temperatura de 300 K. As trajetórias DM resultantes dos complexos ligante-Mpro foram processadas através da ferramenta CPPTRAJ para gerar os gráficos de desvio quadrático médio (RMSD) e a flutuação quadrática média por resíduo ou RMSF.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

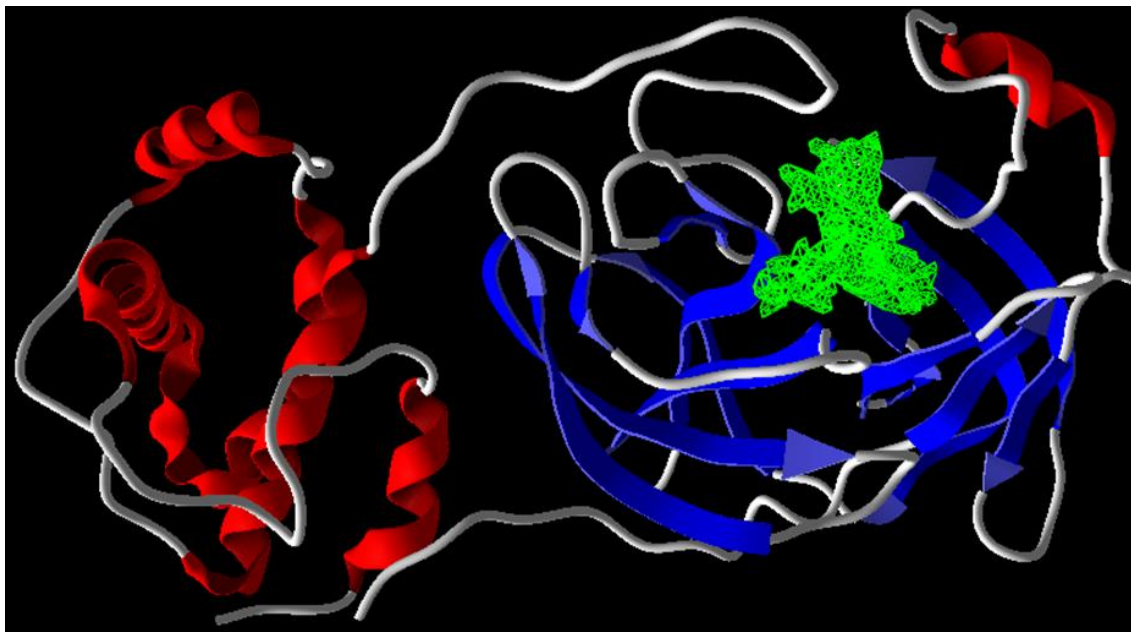
Analisando as figuras 11, 12 e 13 em comparação com a figura 14, é possível observar que a localização do sítio ativo selecionado na docagem condiz com o relatado por Dai et al, 2020.

Figura 11: Estrutura cristalográfica em 3D da enzima Mpro do SARS-CoV-2, com sítio ativo destacado em verde.



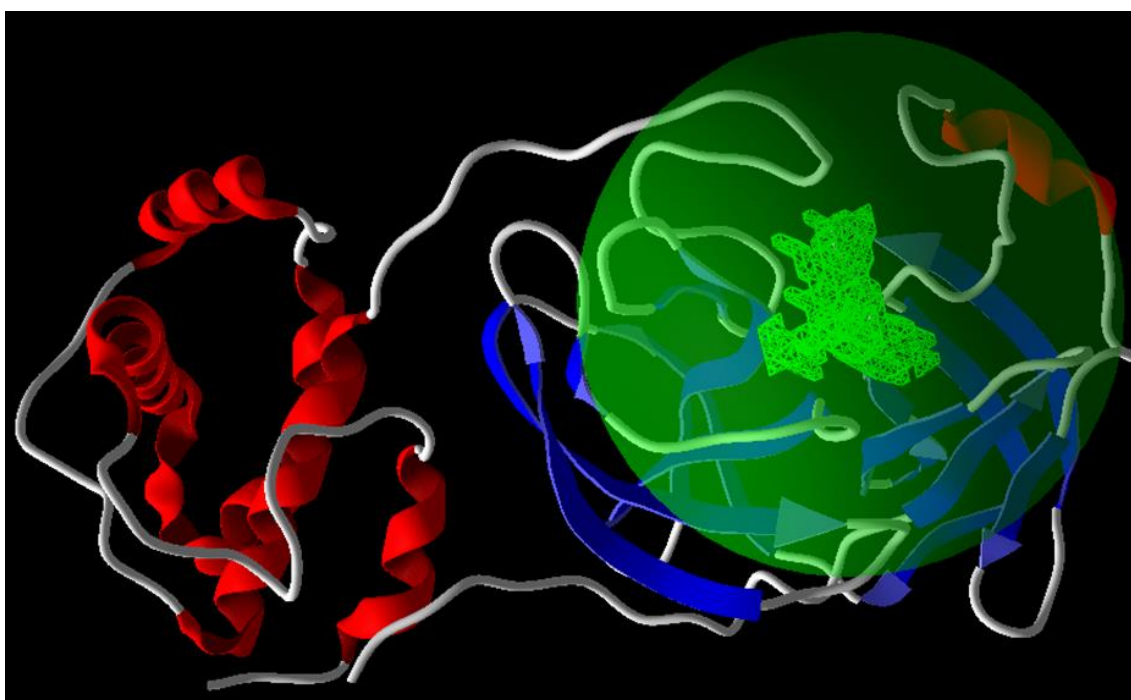
Fonte: Autoria própria.

Figura 12: Representação 3D em *backbone* da cadeia da enzima Mpro da SARS-CoV-2, com sítio ativo destacado em verde.



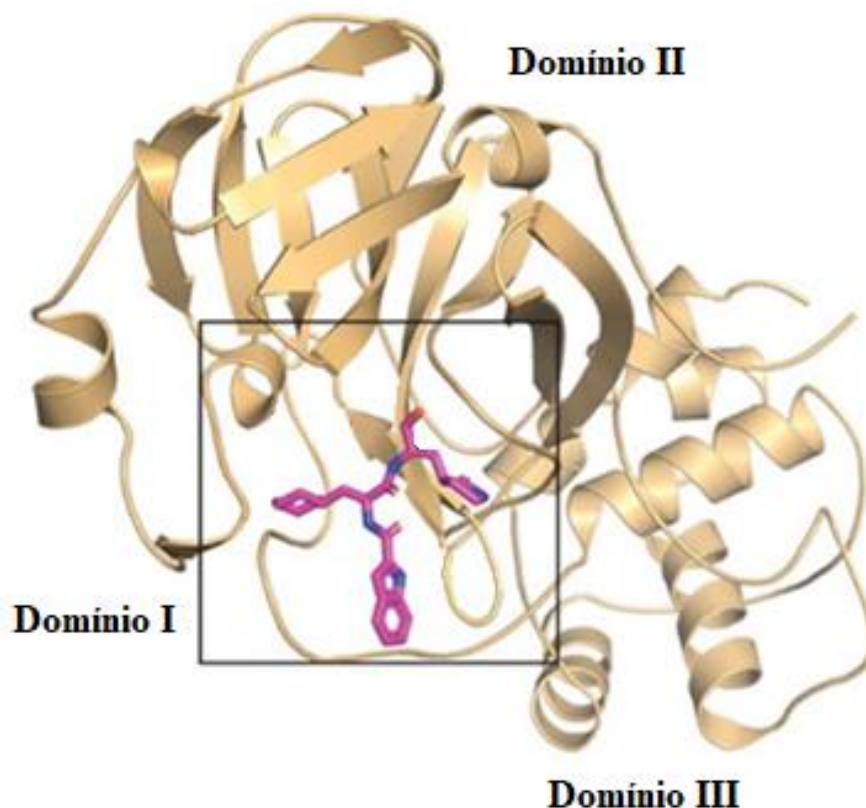
Fonte: Autoria própria.

Figura 13: Representação da região do *grid* (campo destacado em verde) utilizado para a docagem molecular na enzima Mpro.



Fonte: Autoria própria.

Figura 14: Representação em 3D da estrutura cristalina da enzima Mpro do SARS-CoV-2 em complexo com ligante cristalográfico no sítio ativo.

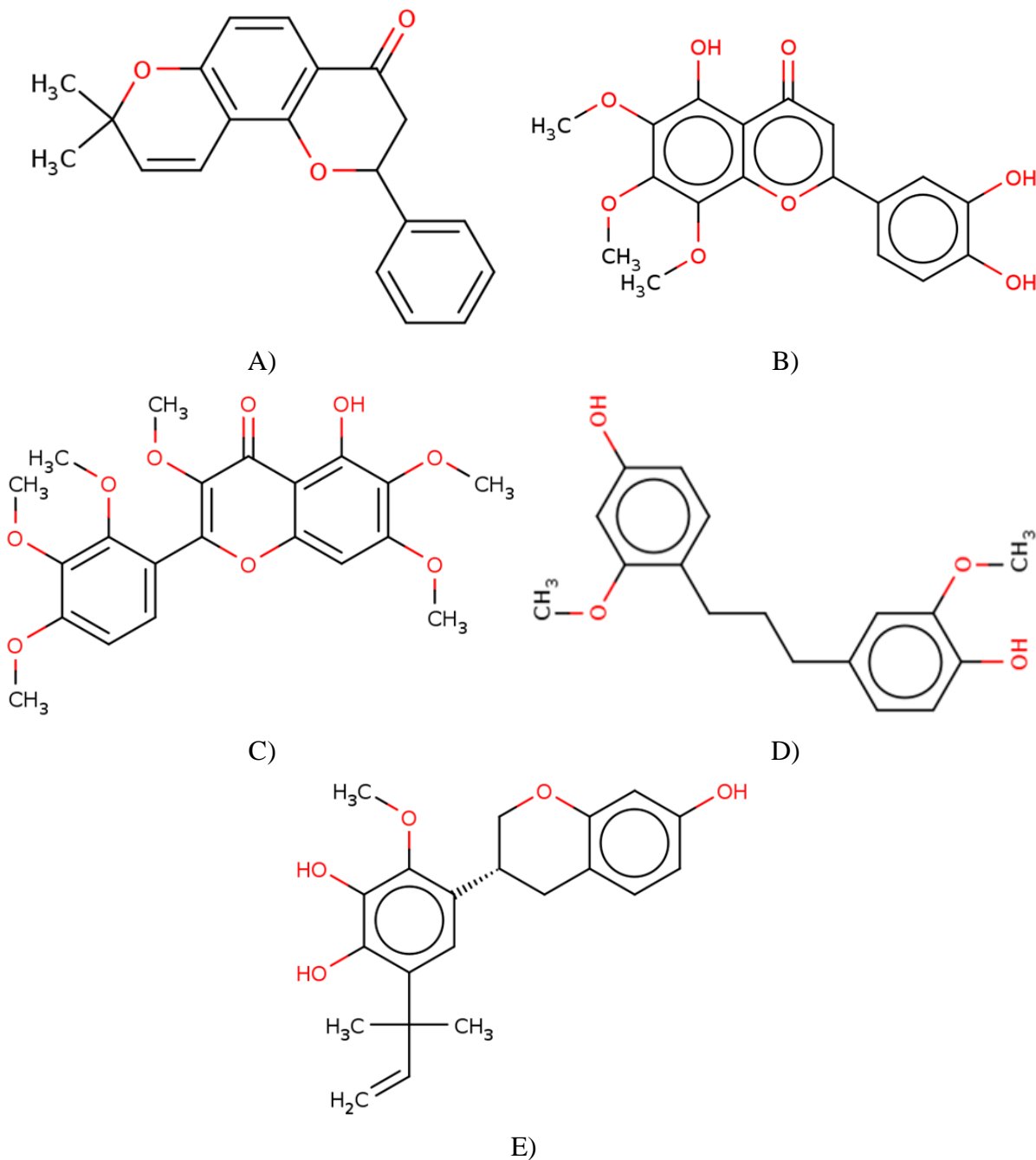


Fonte: Adaptado de DAI et al, 2020.

Os 204 flavonoides que se adequaram a regra dos cinco de Lipiski foram submetidos a cálculo de docagem molecular no programa GOLD que por sua vez gerou valor de afinidade de ligação para cada ligante. Primeiramente, os valores de afinidade de ligação previstos foram verificados e classificados de acordo com a função de pontuação do ChemPLP observado no estudo de encaixe. Os valores de energia de ligação previstos pelo GOLD de todos os 204 flavonoides são fornecidos no anexo I. Posteriormente os cinco ligantes com as melhores afinidades de ligação (tabela 2) foram selecionados e suas interações com os resíduos de aminoácidos do sítio da Mpro foram analisadas após o encaixe. Os valores de energia de afinidade dos cinco melhores ligantes são mostrados na tabela 2.

Na Figura 15 as estruturas químicas dos cinco ligantes mais bem pontuados são representadas em 2D, bem como seus respectivos nomes segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada).

Figura 15: Representação em 2D dos compostos A) NuBBE_1317 (12,12-dimethyl-4-phenyl-3,11-dioxatriciclo[8.4.0.0²,7]tetradeca-1(10),2(7),8,13-tetraen-6-one), B) NuBBE_2523 (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-6,7,8-trimethoxy-4H-chromen-4-one), C) NuBBE_1878 (5-hydroxy-3,6,7-trimethoxy-2-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-4H-chromen-4-one), D) NuBBE_2222 (4-[3-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)propyl]-2-methoxyphenol) e E) NuBBE_2417 (4-[(3R)-7-hydroxy-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-3-yl]-3-methoxy-6-(2-methylbut-3-en-2-yl)benzene-1,2-diol).



Fonte: NuBBEDB, 2022.

Tabela 2: Resultados de docagem molecular obtidos com o software GOLD dos cinco flavonoides com melhores energia de afinidade.

Ligantes	ChemPLP (kcal.mol⁻¹)
NuBBE_1317	61,308
NuBBE_2523	60,956
NuBBE_1878	60,281
NuBBE_2222	59,447
NuBBE_2417	59,534

Fonte: Autoria própria.

A tabela 3 mostra os cinco ligantes selecionados se adaptaram ao RO5 sem ocorrência em qualquer violação do RO5, bem como o ligante cristalográfico 11b de acordo com o servidor SWISSADME (DAINA et al, 2017.) Com base nas regras RO5, os ligantes podem ser selecionados como candidatos a planejamento de fármacos contra a Mpro do COVID-19.

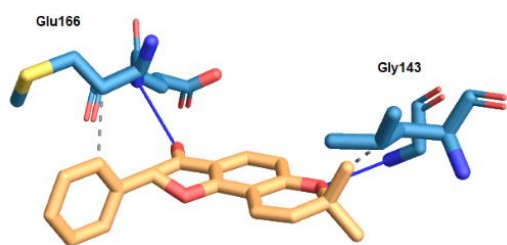
Tabela 3: Regra dos cinco (RO5) de Lipinski para o inibidor 11b e os 5 ligantes em destaque.

Ligantes	Fórmula molecular	Peso molecular ≤500	LogP ≤5	Doador de ligação H ≤ 5	Aceptor de ligação H ≤ 10	Violações
11b	C35H48N6O8	461,49	2,12	4	5	0
1317	C20H18O3	306,35	4,36	0	3	0
2523	C18H16O8	360,31	2,47	3	8	0
1878	C21H22O9	418,39	3,07	1	9	0
2222	C17H20O4	288,13	3,53	2	4	0
2417	C21H24O5	356,41	4,27	3	5	0

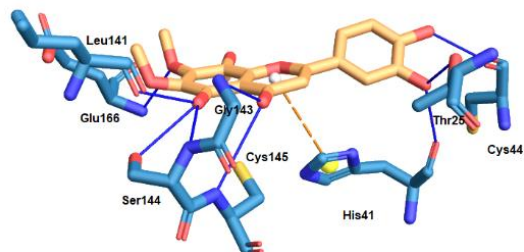
Fonte: Autoria própria.

A visualização em 3D da análise de interação molecular entre os cinco ligantes com as melhores energias de afinidade, e o ligante cristalográfico 11b com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da Mpro de COVID-19 foram previstos pelo servidor PLIP (ADASME et al, 2021) e são mostrados na figura 16.

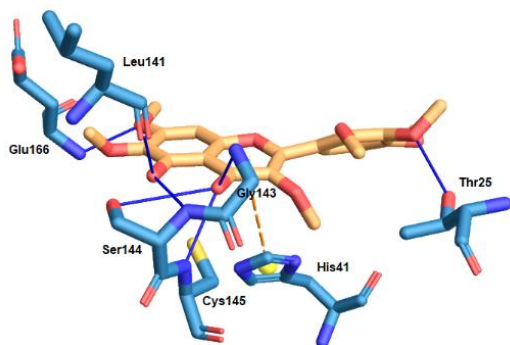
Figura 16: Mapa de interações do ligante A) NuBBE_1317, B) NuBBE_2523, C) NuBBE_1878, D) NuBBE_2222, E) NuBBE_2417 e F) 11b com os resíduos de aminoácidos da enzima Mpro do SARS-CoV-2.



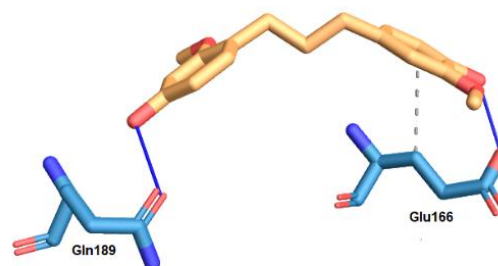
A)



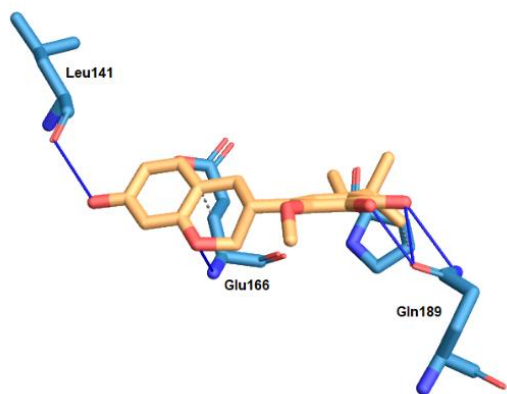
B)



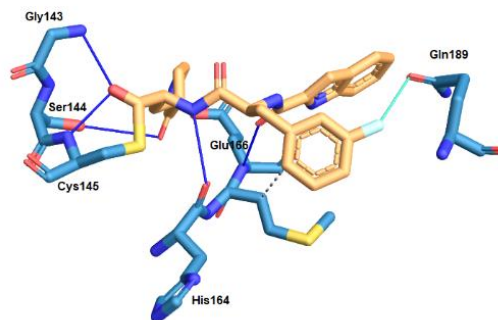
C)



D)



E)



F)

Fonte: Autoria própria.

Na figura 16 as linhas contínuas azul escuro representam ligações de hidrogênio, as linhas contínuas azul claro representam ligações de halogênio, as linhas tracejadas em cinza são ligações hidrofóbicas, e as linhas tracejadas em laranja representam interações π - π (ou π -cátion).

O ligante NuBBE_1317 fez duas ligações de hidrogênio com a Mpro interagindo com os aminoácidos Gly143 e Glu166. Com uma distância de ligação de 2,06 e 2,08 Å, respectivamente. O ligante NuBBE_2523 fez oito ligações de hidrogênio interagindo com Leu141, Glu166, Gly143, Ser144, Cys145, Thr25, Cys44, His41 e uma ligação π - π com His41. Com distância de ligação de 2,10, 2,13, 2,14, 2,71, 3,11, 2,10, 1,92, 1,92 e 4,64 Å, respectivamente.

O ligante NuBBE_1878 fez cinco ligações de hidrogênio interagindo com Thr25, Glu143, Cys145, Ser144, Glu166, Leu141 e uma ligação π - π com His41. Com distância de ligação de 2,09, 1,80, 2,16, 3,06, 1,84, 2,06 e 5,36 Å, respectivamente. O ligante NuBBE_2222 fez duas ligações de hidrogênio interagindo com Gln189 e Glu166. Com distância de ligação de 2,11 e 1,78 Å, respectivamente.

O ligante NuBBE_2417 fez três ligações de hidrogênio interagindo com Leu141, Glu166 e Gln189. Com uma distância de ligação de 2,10, 2,55 e 1,72 Å, respectivamente. O ligante cristalográfico 11b por sua vez apresentou cinco ligações de hidrogênio com Glu143, Ser144, Cys145, Glu166, His164 e uma ligação de halogênio com Gln189. As distancias de ligação foram 2,56, 3,45, 1,93, 2,24, 3,29 e 3,03 Å, respectivamente. Resultados corroborados pela literatura, inclusive por Dai et al em 2020 que encontrou os resíduos His164, Glu166, Gln189 e Cys145 em comum.

Dai et al (2020) afirma que o sítio de ligação da enzima Mpro é localizado na fenda entre os domínios I e II (figura 14) onde Cys145 e His41 (Cys-His) formam uma díade catalítica. No estudo o ligante 11b, cristalográfico e potente inibidor de Mpro SARS-CoV-2, apresentou cinco ligações de hidrogênio com His164, His163, Phe140, Glu166, Gln189 e uma ligação covalente com Cys145.

De acordo com Gomes et al (2021) a díade catalítica His41 e Cys145, juntamente com os aminoácidos, Tyr161 e His163 são cruciais para o reconhecimento do sítio ativo da prótese Mpro. O autor também afirma que existem outros aminoácidos chave e de suma importância, são eles: Thr24, Thr25, Thr26, Met165, Leu167, Gln192, Thr190, Pro168, Ala191, Glu166, Gln189, Met49, Tyr54, Asp187, Arg188, Phe140, Leu141, His163, His172, Asn142, Ser144, His164 e Gly143.

Vijayakumar et al (2022), em seu estudo, também frisa a importância da díade catalítica Cys145 e His41, e destaca a importância dos resíduos Gly143, Ser144, His164 e Glu166.

Há um consenso em relação a importância da díade catalítica Cys-His, porém outros resíduos também se mostram importantes, são eles: His163, His164, His172, Gly143, Ser144, Glu166, Thr24, Thr25, Thr26, Thr190, Leu141, Leu167, Gln189, Gln192, Pro168, Ala191, Met49 Met165, Tyr54, Tyr161, Asp187, Arg188, Phe140 e Asn142.

Todas as interações dos cinco ligantes mais bem pontuados com os resíduos de aminoácidos da Mpro do SARS-CoV-2 foram citados nas referências por se tratar de resíduos importantes na identificação do sítio ativo da enzima Mpro.

A partir da análise de encaixe e tendo as interações com os resíduos de aminoácidos do sítio da Mpro como critério, os ligantes NuBBE_2523 e NuBBE_1878 foram considerados promissores entre todos os flavonoides ancorados na cavidade da proteína Mpro e selecionados para estudo de DM.

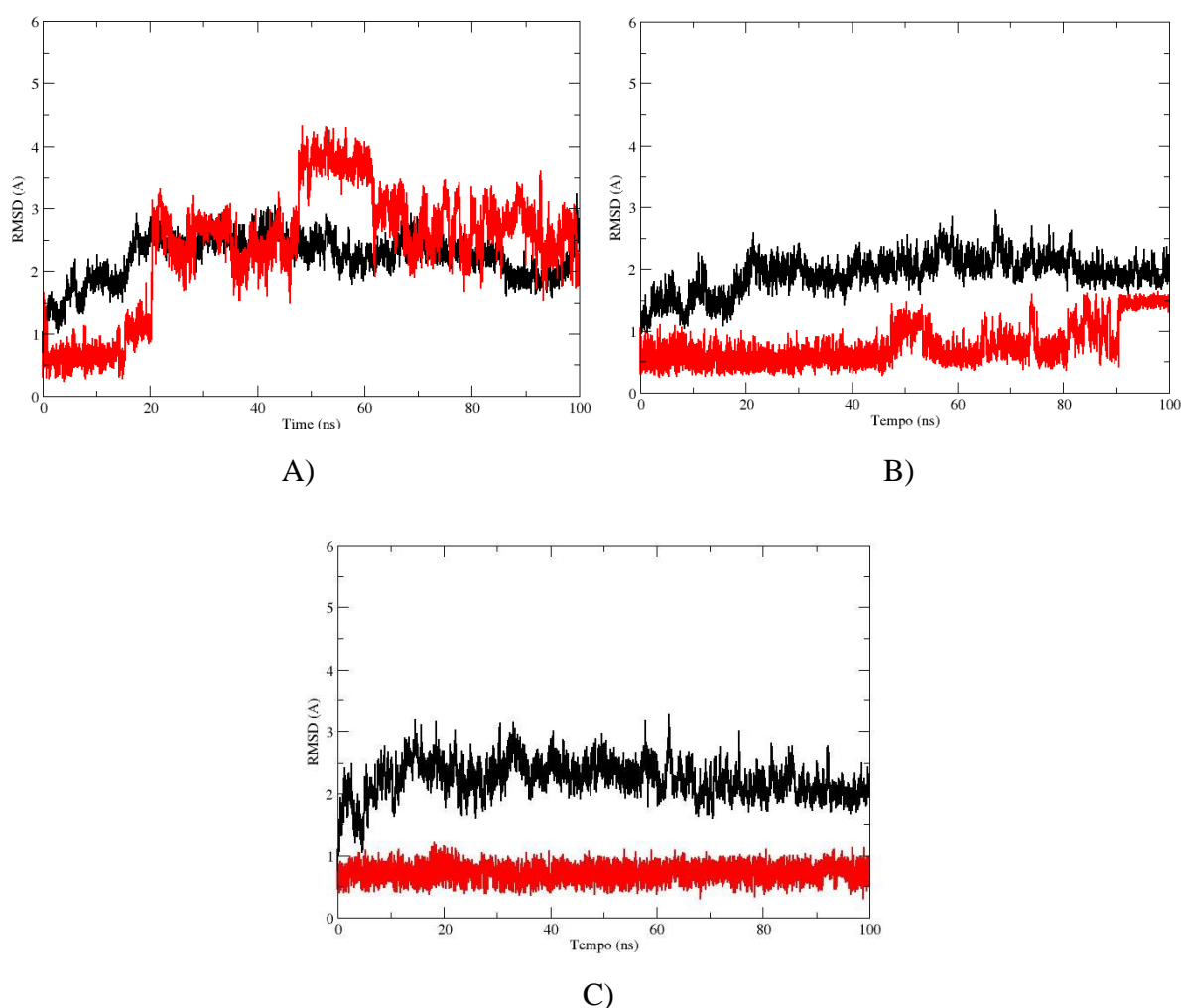
4.1. Simulações de dinâmica molecular

Posteriormente os cinco complexos foram submetidos a investigação da estabilidade conformacional e a capacidade de ligação dependente do tempo de ligantes na bolsa catalítica Mpro de SARS-CoV-2. Embora a ancoragem molecular gere aproximadamente a orientação espacial do ligante dentro da bolsa do receptor, outros fatores de contabilidade, como afinidade de ligação e estabilidade conformacional, precisam ser avaliados rigorosamente para avaliar a potência inibitória de compostos naturais direcionados a Mpro, além da aptidão da bolsa de ligação. A estabilidade conformacional do ligante é essencial para a inibição mediada pelo ligante de Mpro e análise de simulações de dinâmica molecular (DM) oferece um estudo completo da paisagem conformacional de complexos proteína-ligando próximo à condição fisiológica real. (PATEL et al, 2021).

Simulações DM independentes foram realizadas para Mpro em complexo com 11b (ligante experimental), NuBBE_2523, NuBBE_1878, NuBBE_1317, NuBBE_2222 e NuBBE_2417. A trajetória MD obtida foi utilizada para investigar o equilíbrio da dinâmica em função do tempo. Uma visão sobre a convergência de complexos de proteína-ligante simulados pode ser alcançada levando em consideração o RMSD da estrutura inicial e a estrutura simulada média de todos os quadros de trajetória DM. Um valor de RMSD mais baixo indica uma maior estabilidade do complexo proteico. Calculou-se o RMSD dos complexos em relação ao átomo de C α e da estrutura molecular dos ligantes em relação ao tempo de simulação DM. No geral, o RMSD médio para todos os três complexos foi baixo,

variando de 2,22, 1,92 e 2,22 Å para os sistemas onde o receptor foi complexado com as moléculas 11b, NuBBE_2523 e NuBBE_1878, respectivamente. Esses valores demonstraram a estabilidade dos complexos ancorados e que está de boa concordância com a simulação do ligante experimental 11b. Além disso, as variações de RMSD foram < 3 Å para compostos totalmente naturais. Essas variações estão dentro das flutuações que geralmente são vistas para proteínas desse tamanho, como também foi mostrado anteriormente por um estudo DM de SARS-CoV-2 Mpro. (SUÁREZ et al, 2020).

Figura 17: RMSDs da estrutura proteica (em preto) e inibidores (em vermelho) para A) 11b, B) NuBBE_2523 e C) NuBBE_1878.



Fonte: Autoria própria.

No geral, os valores médios baixos de RMSD observados nos três complexos proteína-ligando indicaram forte ligação entre os ligantes e a proteína.

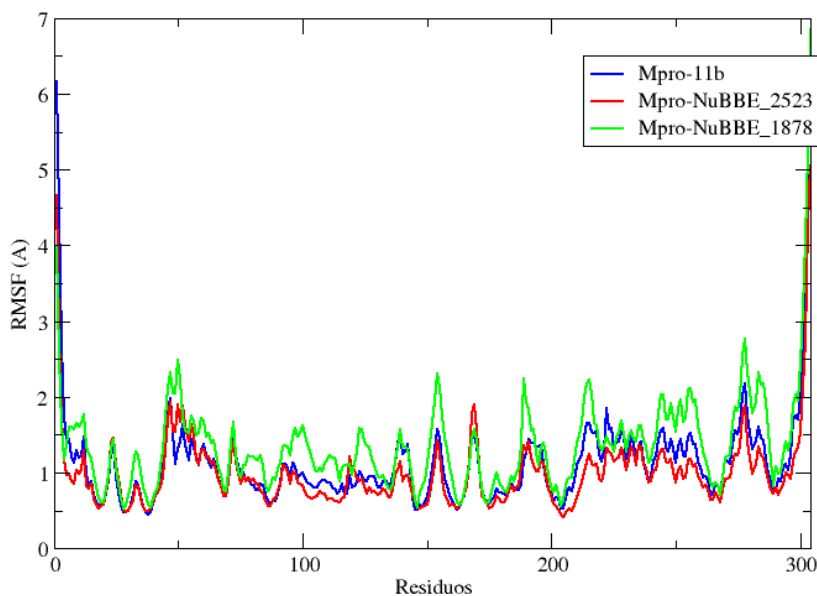
A estabilidade estrutural dos ligantes no sítio ativo da proteína também foi avaliada usando o RMSD. Os gráficos para os três inibidores (figura 17) são mostrados na cor vermelha. A molécula NuBBE_2523 alcançou estabilidade estrutural desde o início da

simulação com valor médio de RMSD de 0,76 Å, porém, por volta de 90 ns, seu RMSD sofreu algumas oscilações. O ligante NuBBE_1878, também, atingiu uma conformação estável logo no início da simulação com um valor médio de RMSD de 0,72 Å. A maior instabilidade conformacional foi observada para o inibidor 11b com um valor médio de RMSD de 2,38 Å. Várias oscilações foram observadas em seu gráfico RMSD, entretanto, nos últimos 40 ns, o RMSD desta molécula mostrou tendência a atingir um equilíbrio. É importante notar que, apesar dessa falta de estabilidade, o 11b permaneceu no sítio de ligação da proteína.

Os ligantes NuBBE_2523 e NuBBE_1878 foram melhor ajustados ao bolso de ligação do alvo Mpro em comparação com o inibidor 11b. As estabilidades observadas dos ligantes são devido às suas interações com os resíduos do sítio de ligação da Mpro.

Resíduos de aminoácidos individuais desempenham um papel crucial na estabilidade do complexo proteína-ligante. O RMSF fornece informações profundas sobre cada flutuação de resíduos de aminoácidos da proteína na simulação dinâmica molecular. Os valores de RMSF dos três complexos (11b, NuBBE_2523 e NuBBE_1878) foram calculados e são mostrados na Figura 18.

Figura 18: RMSF em função do número de resíduos dos complexos.



Fonte: Autoria própria.

Em geral, os perfis dos gráficos são semelhantes, com algumas diferenças nas flutuações para o complexo Mpro-NuBBE_1878 que apresenta uma maior flutuação quando comparado com os complexos Mpro-11b e Mpro-NuBBE_2523. O complexo Mpro-NuBBE_2523 é o que no geral possui uma menor flutuação e essa observação está de acordo com os resultados de RMSD em que esse complexo possui um menor desvio. A observação

acima indicou claramente que não houve flutuação significativa de qualquer resíduo de aminoácido durante todo o processo de simulação.

5. CONCLUSÃO

Os encaixes moleculares, realizados por este estudo, identificaram alguns novos produtos naturais da classe dos flavonoides como inibidores promissores contra a Mpro de SARS-CoV-2, destacaram-se os ligantes NuBBE_2523 e NuBBE_1878.

Traçou-se as interações dos ligantes sugeridos com a proteína Mpro de SARS-CoV-2 para prever o modo de ligação com o seu sítio ativo.

Para corroborar com os resultados de ancoragem molecular, realizou-se simulações de DM que confirmaram a estabilidade dos complexos de ligantes para os candidatos identificados.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho possui como perspectiva futuras para sua continuação uma simulação de mais 100 ns de dinâmica molecular para análise do raio de giro (Rg) e da área de superfície acessível ao solvente (SASA) para avaliar as estabilidades dos complexos. Serão realizados os cálculos de energia livre de ligação dos complexos usando a abordagem MM/PBSA e MM/GBSA.

Pretende-se, também, publicar um artigo científico em revista científica de periódicos internacional.

REFERÊNCIAS

ADASME, Melissa F. et al. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. **Nucleic acids research**, v. 49, n. W1, p. W530-W534, 2021.

ANDERSEN, Kristian G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature medicine**, v. 26, n. 4, p. 450-452, 2020.

BARREIRO, Eliezer J. et al. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química nova**, v. 20, p. 300-310, 1997.

BORETTI, Alberto; BANIK, Bimal; CASTELLETTO, Stefania. Use of ultraviolet blood irradiation against viral infections. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 60, n. 2, p. 259-270, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica n.º 127/2021-CGPNI/DEIDT/SVS/MS. Atualização dos dados sobre variantes de atenção do SARS-CoV-2 no Brasil, até 20 de fevereiro de 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/23/nota-tecnica-n-127-2021-novas-variantes.pdf>.

BRASIL. Ministério da saúde. Nota Técnica n.º 52/2021-CGPNI/DEIDT/SVS/MS. Boletim Epidemiológico N° 93 - Boletim COE Coronavírus, até 25 de dezembro de 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/covid-19/2021/boletim_epidemiologico_covid_93.pdf/view

CARTAYA, O.; REYNALDO, Inés. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. **Cultivos tropicales**, v. 22, n. 2, p. 5-14, 2001.

CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 418-423, 2020.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química, Rio de Janeiro**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CUMMINS, Cathal P. et al. The dispersion of spherical droplets in source–sink flows and their relevance to the COVID-19 pandemic. **Physics of Fluids**, v. 32, n. 8, p. 083302, 2020.

CYRANOSKI, David. Profile of a killer: the complex biology powering the coronavirus pandemic. **Nature**, v. 581, n. 7806, p. 22-27, 2020.

DAI, Wenhao et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 368, n. 6497, p. 1331-1335, 2020.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

DARDEN, Tom; YORK, Darrin; PEDERSEN, Lee. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, v. 98, n. 12, p. 10089-10092, 1993.

DE SANT'ANNA, Carlos MR et al. Molecular modeling on platelet-activating factor (PAF) and new proposed PAF antagonists. **International journal of quantum chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1069-1080, 1996.

GAUSSIAN09, Revision A. 1, mj frisch, gw trucks, hb schlegel, ge scuseria, ma robb, jr cheeseman, g. Scalmani, v. Barone, b. Mennucci, ga petersson et al., gaussian. **Inc., Wallingford CT**, v. 121, p. 150-166, 2009.

GEISER, Marianne; KREYLING, Wolfgang G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2010.

GOMES, José Gabriel Fontenele; DE BARROS LEITE, Neirigelson Ferreira. Flavonoides das plantas do gênero Lavandula como potenciais inibidores de proteínas-chave do SARS-CoV-2. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e345101220580-e345101220580, 2021.

GONÇALVES, A. S. Estudo por dinâmica molecular das interações da pralidoxima e da deazapralidoxima com a acetilcolinesterase humana inibida pelo agente neurotóxico tabun. 125 p. Dissertação (Mestrado em Química) – **Instituto Militar de Engenharia**, Rio de Janeiro. 2005.

GORBALENYA, Alexander E. et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. 2020.

GOYAL, Bhupesh; GOYAL, Deepti. Targeting the dimerization of the main protease of coronaviruses: a potential broad-spectrum therapeutic strategy. **ACS combinatorial science**, v. 22, n. 6, p. 297-305, 2020.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

JIN, Zhenming et al. Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289-293, 2020.

JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

LEE, Tai-Sung et al. GPU-accelerated molecular dynamics and free energy methods in Amber18: performance enhancements and new features. **Journal of chemical information and modeling**, v. 58, n. 10, p. 2043-2050, 2018.

LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001.

LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIPINSKI, Christopher A. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug discovery today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.

MAIER, James A. et al. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. **Journal of chemical theory and computation**, v. 11, n. 8, p. 3696-3713, 2015.

MANLY, Charles J. et al. Strategies and tactics for optimizing the Hit-to-Lead process and beyond—A computational chemistry perspective. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3-4, p. 99-109, 2008.

MILNE, G. W. A.; NICKLAUS, M. C.; HODOŠČEK, Milan. Molecular modeling in solvent. **Journal of molecular structure**, v. 291, n. 1, p. 89-103, 1993.

NAMBA, Adriana Mieco; DA SILVA, Vinícius Barreto; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, v. 33, p. 13-24, 2008.

Organização Mundial da Saúde. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/atualizacao-epidemiologica-variantes-SARS-CoV-2-nas-americas-26-janeiro-2021>.

Organização Mundial da Saúde. Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents temporally related to COVID-19. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/multisystem-inflammatorysyndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>.

PESCARINI, Julia Moreira et al. Influence of age on the effectiveness and duration of protection in Vaxzevria and CoronaVac vaccines. **medRxiv** 2021.

PESCARINI, Julia Moreira et al. Métodos para avaliação da efetividade de vacinas para COVID-19 com ênfase em abordagens quase-experimentais. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, p. 5599-5614, 2021.

PIETRALONGA, Tiago Cetto et al. ESTUDO COMPUTACIONAL DE REATIVADORES DA ACETILCOLINESTERASE INIBIDA PELO PESTICIDA AGRÍCOLA FENAMIFÓS. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 2, p. 51-64, 2015.

PILON, Alan C. et al. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

PISHKO, Allyson M.; BUSSEL, James B.; CINES, Douglas B. COVID-19 vaccination and immune thrombocytopenia. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1145-1146, 2021.

RABI, Firas A. et al. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: what we know so far. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 231, 2020.

RICHARD, Mathilde et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 2020.

RUDNITSKAYA, Aleksandra; TÖRÖK, Béla; TÖRÖK, Marianna. Molecular docking of enzyme inhibitors: A COMPUTATIONAL TOOL FOR STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 38, n. 4, p. 261-265, 2010.

RYCKAERT, Jean-Paul; CICCOTTI, Giovanni; BERENDSEN, Herman JC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of computational physics**, v. 23, n. 3, p. 327-341, 1977.

SANTOS et al. Abordagem Didática Para O Desenvolvimento De Moléculas Bioativas: Regra Dos Cinco De Lipinski E Preparação De Heterociclo 1, 3, 4-Oxadiazol Em Forno De Micro-Ondas Doméstico. **Química Nova**, v. 41, p. 110-115, 2018

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, Macapá, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017. Disponível em: <https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao>. Acesso em: 29 mar. 2021.

SANTOS, Ricardo N.; ANDRICOPULO, Adriano D. Physics and its interfaces with medicinal chemistry and drug design. **Brazilian Journal of Physics**, v. 43, n. 4, p. 268-280, 2013.

SILVEIRA, Camila Pedroso et al. A nano perspective behind the COVID-19 pandemic. **Nanoscale Horizons**, v. 6, n. 11, p. 842-855, 2021.

SUÁREZ, Dimas; DÍAZ, Natalia. SARS-CoV-2 main protease: A molecular dynamics study. **Journal of chemical information and modeling**, v. 60, n. 12, p. 5815-5831, 2020.

VEBER, Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VIJAYAKUMAR, Mayakrishnan et al. In silico identification of potential inhibitors against main protease of SARS-CoV-2 6LU7 from *Andrographis paniculata* via molecular docking, binding energy calculations and molecular dynamics simulation studies. **Saudi journal of biological sciences**, v. 29, n. 1, p. 18-29, 2022.

WANG, J. et al. PA & Case, DA Desenvolvimento e teste de um campo de força geral Amber. **J. Computação. Química** 25 , p. 1157-1174, 2004.

WEBER, Thomas P.; STILIANAKIS, Nikolaos I. Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: a critical review. **Journal of infection**, v. 57, n. 5, p. 361-373, 2008.

WERNER, Tim et al. Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 4, p. 323-343, 2012.

ZHANG, Linlin et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. **Science**, v. 368, n. 6489, p. 409-412, 2020.

ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

ZHOU, Peng et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 255-258, 2018.

ZHU, Na et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, 2020.

ANEXO I – VALORES DE ENERGIA DE LIGAÇÃO DOS 204 FLAVONOIDES CONSIDERADOS NO ESTUDO.

Ligantes	ChemPLP	NuBBE_1188	46.6203
NuBBE_67	50.4485	NuBBE_1189	50.6717
NuBBE_68	49.6825	NuBBE_1205	55.7289
NuBBE_120	49.8464	NuBBE_1206	45.7182
NuBBE_122	51.4298	NuBBE_1215	42.2407
NuBBE_126	51.7583	NuBBE_1216	44.0259
NuBBE_128	56.4279	NuBBE_1217	52.8011
NuBBE_139	50.5077	NuBBE_1218	51.5036
NuBBE_141	56.0326	NuBBE_1219	54.7358
NuBBE_177	39.7338	NuBBE_1220	50.4571
NuBBE_178	39.1702	NuBBE_1221	49.5860
NuBBE_179	45.3669	NuBBE_1222	47.3260
NuBBE_180	48.2807	NuBBE_1223	57.2974
NuBBE_181	45.2445	NuBBE_1224	51.8934
NuBBE_287	52.6458	NuBBE_1225	46.7448
NuBBE_292	45.2957	NuBBE_1226	47.4861
NuBBE_293	48.2561	NuBBE_1263	53.4649
NuBBE_320	47.3033	NuBBE_1305	46.7087
NuBBE_355	47.7041	NuBBE_1306	46.9319
NuBBE_363	50.7919	NuBBE_1307	49.6112
NuBBE_426	51.4049	NuBBE_1308	45.3233
NuBBE_562	47.6101	NuBBE_1309	46.5756
NuBBE_563	46.5673	NuBBE_1310	51.8986
NuBBE_564	55.7366	NuBBE_1311	42.9482
NuBBE_565	44.5483	NuBBE_1312	32.0020
NuBBE_567	51.0909	NuBBE_1313	47.8753
NuBBE_866	53.4131	NuBBE_1314	50.1313
NuBBE_867	50.5838	NuBBE_1316	49.8196
NuBBE_1045	43.1745	NuBBE_1317	61.3085
NuBBE_1046	50.5527	NuBBE_1318	41.4529
NuBBE_1073	52.6858	NuBBE_1320	58.5348

NuBBE_1321	39.9306	NuBBE_1766	49.6824
NuBBE_1322	51.5197	NuBBE_1768	49.2126
NuBBE_1327	50.4820	NuBBE_1769	45.4774
NuBBE_1328	50.8049	NuBBE_1776	48.4579
NuBBE_1333	47.4446	NuBBE_1777	37.5993
NuBBE_1443	45.7580	NuBBE_1784	47.6429
NuBBE_1444	49.2177	NuBBE_1787	53.6552
NuBBE_1445	48.9152	NuBBE_1814	49.1869
NuBBE_1472	45.5607	NuBBE_1815	42.3782
NuBBE_1557	43.2107	NuBBE_1844	52.7671
NuBBE_1558	43.9739	NuBBE_1864	50.4443
NuBBE_1559	47.4320	NuBBE_1865	44.3218
NuBBE_1560	51.2311	NuBBE_1866	40.0635
NuBBE_1562	46.0842	NuBBE_1867	55.1828
NuBBE_1580	39.1302	NuBBE_1868	50.9291
NuBBE_1581	42.5785	NuBBE_1869	48.1520
NuBBE_1582	46.6146	NuBBE_1870	48.4986
NuBBE_1586	43.8397	NuBBE_1871	49.4110
NuBBE_1588	45.5057	NuBBE_1872	52.0574
NuBBE_1589	50.4126	NuBBE_1873	54.9572
NuBBE_1590	42.9649	NuBBE_1874	47.4599
NuBBE_1591	44.0784	NuBBE_1875	45.4181
NuBBE_1592	42.4793	NuBBE_1878	60.2817
NuBBE_1593	40.3799	NuBBE_1879	49.9534
NuBBE_1625	41.9930	NuBBE_1880	56.9728
NuBBE_1656	52.0107	NuBBE_1883	46.7337
NuBBE_1662	46.3275	NuBBE_1884	44.1800
NuBBE_1663	46.6957	NuBBE_1886	47.0107
NuBBE_1692	56.6106	NuBBE_1888	54.9436
NuBBE_1693	50.6535	NuBBE_1889	51.5827
NuBBE_1694	58.2300	NuBBE_1890	39.4664
NuBBE_1695	51.9883	NuBBE_1892	50.4714
NuBBE_1765	48.4187	NuBBE_1893	47.3458

NuBBE_1894	41.3809	NuBBE_2082	55.2713
NuBBE_1895	40.5503	NuBBE_2083	47.7792
NuBBE_1908	43.9606	NuBBE_2172	55.2335
NuBBE_1995	42.9082	NuBBE_2173	49.8363
NuBBE_1996	48.1610	NuBBE_2174	43.2019
NuBBE_1997	42.7468	NuBBE_2175	51.0963
NuBBE_1999	41.3555	NuBBE_2222	59.4661
NuBBE_2000	49.9970	NuBBE_2224	48.2974
NuBBE_2001	43.3469	NuBBE_2255	45.5886
NuBBE_2003	45.5161	NuBBE_2275	51.2967
NuBBE_2004	46.0416	NuBBE_2279	47.6932
NuBBE_2005	41.9605	NuBBE_2280	43.6530
NuBBE_2006	43.0952	NuBBE_2282	49.2738
NuBBE_2007	49.0224	NuBBE_2328	55.1560
NuBBE_2008	48.2484	NuBBE_2386	46.2783
NuBBE_2018	58.0736	NuBBE_2399	58.5256
NuBBE_2019	45.7273	NuBBE_2401	43.9296
NuBBE_2020	50.9660	NuBBE_2402	45.0283
NuBBE_2021	50.7921	NuBBE_2413	43.9115
NuBBE_2022	44.9612	NuBBE_2415	50.7246
NuBBE_2023	47.1167	NuBBE_2416	49.0573
NuBBE_2024	50.1387	NuBBE_2417	59.4471
NuBBE_2025	45.2323	NuBBE_2427	53.3775
NuBBE_2033	46.2893	NuBBE_2430	51.7226
NuBBE_2034	46.2224	NuBBE_2431	50.0203
NuBBE_2035	49.7676	NuBBE_2432	49.2105
NuBBE_2036	49.4428	NuBBE_2434	45.3556
NuBBE_2046	47.0910	NuBBE_2443	43.4979
NuBBE_2047	48.3183	NuBBE_2447	44.3296
NuBBE_2048	48.9537	NuBBE_2448	42.3752
NuBBE_2049	43.2769	NuBBE_2449	45.4879
NuBBE_2080	54.1459	NuBBE_2450	52.2319
NuBBE_2081	50.3746	NuBBE_2451	48.1497

NuBBE_2452	47.2659
NuBBE_2485	44.1014
NuBBE_2486	47.8525
NuBBE_2508	43.0325
NuBBE_2509	45.7587
NuBBE_2510	46.3505
NuBBE_2511	50.9704
NuBBE_2522	55.9749
NuBBE_2523	60.9568
NuBBE_2524	44.9341
NuBBE_2526	40.9816
