



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA

**O ESTUDO DA DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE POTENCIAIS
FÁRMACOS: RODATINA, SCEDAPINA C E CEQUINADOLINA A,
UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA SARS-COV-2**

**Belém - PA
Maio de 2022**

ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA

**O ESTUDO DA DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE POTENCIAIS
FÁRMACOS: RODATINA, SCEDAPINA C E CEQUINADOLINA A,
UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA SARS-COV-2**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto.

Coorientador: Dr. Ossalin de Almeida

Belém - PA

Maio de 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

SANTOS LIMA, ANTONIO SANDERLEI DOS.

O estudo da docagem e dinâmica molecular de
potenciais fármacos: Rodatina, Scedapina C e
Cequinadolina A, utilizados no tratamento da SARS-CoV-2 /
ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA. — 2022.
99 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves
Neto

Coorientador(a): Prof. Dr. Ossalin de Almeida
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, Belém, 2022.

1. Vírus. 2. Infectados. 3. Docking Molecular. 4.
Potencial. I. Título.

CDD 660.28

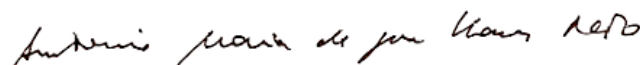
ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA

**O ESTUDO DA DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE
POTENCIAIS FÁRMACOS: RODATINA, SCEDAPINA C E
CEQUINADOLINA A, UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA SARS-
COV-2**

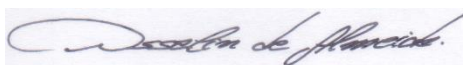
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Data de aprovação: 06 de maio de 2022.

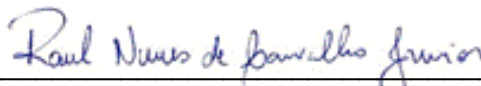
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto.
(Orientador – PPGEQ/UFGA)



Dr. Ossalin de Almeida
(Coorientador – ICEN/UFGA)



Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(Membro interno – PPGEQ/UFGA)



Prof. Dr. Abel Ferreira Gomes Neto
(Membro Externo à instituição - IFPA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
POS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 153/2022 - PPE Q (11.41.20)

Nº do Protocolo: 23073.039765/2022-03

Belém-PA, 19 de julho de 2022.

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, NA ÁREA DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS - **ENGENHARIA DE PROCESSOS ORGÂNICOS**, REALIZADA EM **06 DE MAIO DE 2022**, TENDO INÍCIO ÀS 16 HORAS, APRESENTADA PELO CANDIDATO **ANTÔNIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA** DIANTE DA BANCA EXAMINADORA CONSTITUÍDA PELO PRESIDENTE Prof. Dr. ANTONIO MAIA DE JESUS CHAVES NETO - ORIENTADOR; E PELOS MEMBROS: Dr. OSSALIN DE ALMEIDA - COORIENTADOR, Prof. Dr. RAUL NUNES DE CARVALHO JUNIOR - MEMBRO INTERNO E Prof. Dr. ABEL FERREIRA GOMES NETO - MEMBRO EXTERNO. A DISSERTAÇÃO INTITULADA **"O ESTUDO DA DINÂMICA E DOCAGEM MOLECULAR DE POTENCIAIS FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA COVID-19"** FOI EXPOSTA EM SESSÃO PÚBLICA NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PPGEQ/UFGA, POR VIDEOCONFERÊNCIA, PELO CANDIDATO DURANTE 50 MINUTOS. EM SEGUIDA FOI ARGÜIDO ORALMENTE PELOS MEMBROS DA BANCA, DEMONSTRANDO SUFICIÊNCIA DE CONHECIMENTO NO TEMA ABORDADO. A BANCA EXAMINADORA OPINOU DE FORMA FAVORÁVEL À APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO COM AS RESTRIÇÕES DE: ALGUMAS CORRECÇÕES E ALTERAR O TÍTULO PARA: **O Estudo da Docagem e Dinâmica Molecular de Potenciais Fármacos: Rodatina, Scedapina C e Cequinadolina A, utilizados no Tratamento da SARS-CoV-2** NA FORMA REGULAMENTAR FOI LAVRADA A PRESENTE ATA, ASSINADA PELOS MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA E PELO CANDIDATO.

Belém, 06 de maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE: Prof. Dr. Antônio Maia de Jesus Chaves Neto (PPGEQ/ITEC/UFGA - O r i e n t a d o r)

M E M B R O S :

Dr.	Ossalin	de	Almeida	(ICEN/UFGA	-	Coorientador)	
Prof.	Dr.	Raul	Nunes	de	Carvalho	Junior	(PPGEQ/ITEC/UFGA)
Prof.	Dr.	Abel	Ferreira	Gomes	Neto		(IFPA/Paragominas)

CANDIDATO: Antônio Sanderlei dos Santos Lima

(Assinado digitalmente em 19/07/2022 13:34)
ANTONIO MAIA DE JESUS CHAVES NETO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ICEN (11.34)
Matricula: ###529#2

(Assinado digitalmente em 19/07/2022 13:37)
OSSALIN DE ALMEIDA
TECNICO EM QUIMICA
ICEN (11.34)
Matricula: ###51#3

(Assinado digitalmente em 22/07/2022 20:57)
RAUL NUNES DE CARVALHO JUNIOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
ITEC (11.41)
Matricula: ###496#7

(Assinado digitalmente em 20/07/2022 08:56)
ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA
DISCENTE
Matricula: 2019#####1

(Assinado digitalmente em 20/07/2022 01:32)
ABEL FERREIRA GOMES NETO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.642-##

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpa.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número:
153, ano: **2022**, tipo: **ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**, data de emissão: **19/07/2022** e o código de verificação:
4de558b90d

DEDICATÓRIA

Aos Meus Filhos: Bianca Leticia, Ana
Luiza, Eva Maria e San Gabriel.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais Maria Mercedes e Antonio Ribeiro pela motivação, incentivo, amor e carinho durante a minha vida.

Aos meus filhos San Gabriel, Eva Maria, Ana Luiza e Bianca Leticia pela motivação e incentivo de forma direta ou indireta, que me fazem querer ir cada vez mais adiante, obrigado.

Ao Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto pela orientação, dedicação e o constante contato para a realização deste trabalho e de outros que viram.

Ao Dr. Ossalin de Almeida pela orientação e considerações ao trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior e Prof. Dr. Abel Ferreira Gomes Neto, que dedicaram parte de seu tempo para este trabalho.

Aos professores: Dra. Samira Maria Leão de Carvalho, Dr. Lênio José Guerreiro de Faria, e o Sr. Daniel Goes, coordenadora, vice-coordenador e Secretário do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ.

Ao apoio da bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio.

A todos os integrantes do grupo do Laboratório de Preparação e Computação de Nanomateriais (LPCN), em especial ao amigo Tiago Arouche, que sempre esta para ajudar. Obrigado!

A todos os amigos da turma de mestrado: Carla Arnaud, Alefhe Bernad, Thais do Nascimento, Carla Lucia, Karla Suellen, Ana Claudia, Kelly Roberta, Lauro Henrique, Alexandre Augusto, Elio Ferreira e Rafael Silva, pelo tempo que passamos juntos, estudos e dedicação.

O ESTUDO DA DOCAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DE POTENCIAIS FÁRMACOS: RODATINA, SCEDAPINA C E CEQUINADOLINA A, UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA SARS-COV-2

ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto

Coorientador: Prof. Dr. Ossalin de Almeida

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos

Linha de Pesquisa: Engenharia de Processos Orgânicos

RESUMO

Devido ao estudo de novos fármacos no combate ao vírus do SARS-COV-2, o qual está causando a pandemia do COVID-19, neste trabalho, abordamos o uso de três drogas (Rodatina, Scedapina C e Cequinadolina A) como possíveis inibidores da SARS-CoV-2, pois possuem diversas propriedades interativas, mostrando potencial para serem utilizadas no tratamento da doença COVID-19. O docking molecular forneceu informações sobre a energia de afinidade os quais foram -8,186, -9,617, -7,866, -7,601, -7,527 kcal/mol, para as melhores conformações com Cequinadolina A. Os acoplamentos moleculares e energia de afinidade mostraram os resíduos do sítio ativo das macroestruturas, e analisamos o mapa de potencial eletrostático para prever alguns candidatos promissores a antagonistas de vírus. Foram utilizadas técnicas de dinâmica molecular, onde os alvo foram as estruturas externas do vírus, mas especificamente a proteína envelope, protease principal, glicoproteína *Spike*. Utilizando os módulos do GROMACS 2021.2, os resultados mostraram que os ligantes possuem características de interação no decorrer do tempo. A dinâmica molecular forneceu valores entre 1,5 e 4,5Å, para o desvio quadrático médio das posições atômicas. Dentre os resultados obtidos através da dinâmica molecular, notou-se que as ligações de hidrogênio, quando comparadas ao calculo da raiz quadrada do desvio quadrático médio, sofreram mudança na quantidade de ligações de hidrogênio no processo de ligação, de acordo com a proximidade do ligante usado para filtrar poses irreais no encaixe, e também melhorou a precisão do cálculo de energia de ligação. A análise dos acoplamentos moleculares mostraram que os resíduos do sítio ativo S-gly interagiram fortemente com as três drogas. A reutilização desses medicamentos no combate ao SARS-CoV-2 pode ser candidatos via antagonistas do vírus, que se confirmados por meio de abordagens experimentais, podem contribuir para a resolução da crise global da pandemia de COVID-19.

Palavras-chave: Vírus, Infectados, Docking Molecular, Potencial, Dinâmica Molecular.

THE STUDY OF DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS OF POTENTIAL DRUGS: RHODATIN, SCEDAPIN C AND CEQUINADOLINE A, USED IN THE TREATMENT OF SARS-COV-2

ANTONIO SANDERLEI DOS SANTOS LIMA

Advisor: Prof. Dr. Antonio Maia de Jesus Chaves Neto

Co-advisor: Prof. Dr. Ossalin de Almeida

Area of Concentration: Process Development

Line of Research: Organic Process Engineering

ABSTRACT

Due to the study of new drugs to combat the SARS-COV-2 virus, which is causing the COVID-19 pandemic. In this work, we address the use of three drugs (Rhodatin, Scedapin C and Scequinadoline A) as possible inhibitors of SARS-CoV-2, as they have several interactive properties, showing potential to be used in the treatment of COVID-19 disease. Molecular docking provided information about the affinity energy which was -8.186, -9.617, -7.866, -7.601, -7.527 kcal/mol, for the best conformations with Scequinadoline A. Molecular couplings and affinity energy showed the residues of the site macrostructures, and analyzed the electrostatic potential map to predict some promising candidates for virus antagonists. Molecular dynamics techniques were used, where the targets were the external structures of the virus, but specifically the envelope protein, main protease, Spike glycoprotein. Using the GROMACS 2021.2 modules, the results showed that the ligands have characteristics of interaction over time. Molecular dynamics provided values between 1.5 and 4.5Å for the mean square deviation of atomic positions. Among the results obtained through molecular dynamics, it was noted that the hydrogen bonds, when compared to the calculation of the square root of the mean square deviation, underwent a change in the amount of hydrogen bonds in the bonding process, according to the proximity of the ligand used to filter out unrealistic poses in the snap, and also improved the accuracy of binding energy calculation. Analysis of molecular couplings showed that the S-gly active site residues strongly interacted with the three drugs. The reuse of these drugs in the fight against SARS-CoV-2 may be candidates via virus antagonists, which if confirmed through experimental approaches, can contribute to the resolution of the global crisis of the COVID-19 pandemic.

Keywords: Viruses, Infected, Molecular Docking, Potential, Molecular Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos compostos em estudo: a) Rho, b) SceC e c) SeqA.....	20
Figura 2. Macroestruturas utilizadas: a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-pol e) PL-pro.	20
Figura 3. Viral do SARS-Cov-2 (S - glicoproteína de pico, E - proteína de envelope, M- proteína de membrana e N - nucleocapsídeo viral).	24
Figura 4. Fluxograma de Preparação dos receptores e ligantes.....	45
Figura 5. Interações Rodatina-Macroestruturas, a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro.	54
Figura 6. Interações Scedapina- Macroestruturas: a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro.....	58
Figura 7. Interações Cequinadolina- Macroestruturas: a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro.....	62
Figura 8. O potencial eletrostático molecular para o composto do título em: a) Rho, b) Sce, e c) Seq, nível teórico B3LYP / 6-31G (d,p).	66
Figura 9. RMSD versus tempo dos receptores com: a) Rho, b) SceC e c) Seq.....	69
Figura 10. Ligações de hidrogênio versus tempo: a) Rho+E-pro, b) Rho+M-pro, c) Rho+PL-pro, d) Rho+R-pol e e) Rho+S-gly.....	71
Figura 11. Ligações de Hidrogênio versus tempo: a) SceC+E-pro; b) SceC+M-pro; c) SceC+PL-pro; d) SceC+R-poly; e) SceC+S-gly.	74
Figura 12. Ligações de hidrogênio <i>versus</i> tempo: a) SeqA+E-pro; b) SeqA+M-pro; c) SeqA+PL-pro; d) SeqA+R-poly; e) SeqA+S-gly.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Simulações de pontuação do ADV.....	52
---	----

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

ADV = Software Autodock Vina

ADT = Autodock Tools

ACE-2 = Angiotensin-converting enzyme 2

AE = Energia de afinidade

B3LYP = Funcional de densidade híbrida

COV = Coronavírus

COVID-19 = Doença do coronavírus

crio-EM = Microscopia crio-eletrônica

DOC = Docagem Molecular

DM = Dinâmica Molecular

DFT = Teoria do Funcional de Densidade

E-pro = Proteína envelope

FQ = Fumiquinazolinás

fs = femtossegundo

GROMACS = GROningen MAchine for Chemical Simulations

Gaussian = Pacote de software de química computacional

HCoV = Coronavírus Humano

HAT = tripsina-like das vias aéreas humanas protease

HE = hemaglutinina-esterase

HB's = Ligações de Hidrogênio

LGA = Algoritmo genético lamarckiano

MM = Modelagem Molecular

MEP = Mapa de Potencial Eletrostático

MERS-CoV = Coronavirus que causa a síndrome respiratória do Oriente Médio

M-pro = Proteína da membrana

N-pro = Nucleocapsídeo viral

ns = nanosegundo

PL-pro = Papain like protease

R = Constante dos gases ideais.

RMSD = Raiz do desvio quadrático médio

RBD = Receptor binding domain

RdRp = RNA polimerase dependente de RNA

Rho = Rodatina

R-pol = RNA polymerase

SARS = Síndrome respiratória aguda grave

Sce C = Scedapina C

Seq A = Cequinadolina A

S-gly = Glicoproteína de pico

T = Temperatura

VS = virtual-screening

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. CONTEXTO GERAL	16
1.2. MOTIVAÇÃO	18
1.3. OBJETIVOS	21
1.3.1. Objetivo Geral	21
1.3.2. Objetivos Específicos	21
CAPÍTULO 2	22
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1. A COVID-19 E O AGENTE CAUSADOR DA SARS-CoV-2	22
2.1.1. Estrutura do SARS-CoV-2.....	23
2.1.2. Glicoproteína de pico	25
2.1.2.1. Protease principal	26
2.1.2.2. Proteína Envelope	27
2.1.2.3. RNA polymerase (R-pol).....	28
2.1.2.4. Papain like protease (PL-pro)	29
2.2. A COVID-19 E O AGENTE CAUSADOR DA SARS-CoV-2	30
2.2.1. Fármacos Seleccionados Para Estudo	30
2.2.1.1. Rodatina.....	30
2.2.1.2. Scedapina C e Cequinadolina A	31
2.3. MODELAGEM MOLECULAR	32
2.3.1. DFT	32
2.3.2. DOC	33
2.3.3. Mapa de Potencial Eletrostático (MEP).....	38
2.3.4. DM clássica.....	40

CAPÍTULO 3	45
3. METODOLOGIA DA PESQUISA.....	45
3.1. DOC	45
3.1.1. Preparação dos receptores e ligantes.....	45
3.1.2. Protocolo de encaixe usado no ADV.....	47
3.2. MÉTODO DO MEP	48
3.3. PROTOCOLO PARA SIMULAÇÕES DM	49
CAPÍTULO 4	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
4.1. DOC	50
4.1.1. Preparação Obtidos Pelo ADV.....	50
4.2. ANÁLISE DO MEP	65
4.3. DM.....	67
4.3.1. RMSD.....	67
4.3.2. Ligações de Hidrogênio.....	70
CAPÍTULO 5	80
5. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo é apresentada uma abordagem sobre a pandemia da COVID-19 provocada pelo SARS-CoV-2, o que ocasionou a busca por novas terapias e métodos de tratamento, além da possível utilização de medicamentos anti-hepatite como Rodatina (Rho), Scedapina (Sce) e Cequinadolina (Seq) para o combate desta doença. Do mesmo modo, serão introduzidas as motivações deste estudo juntamente com seus objetivos, ou seja, as principais questões relacionadas ao tema e de que forma esses objetivos elencados no trabalho pretendem auxiliar na solução.

1.1. CONTEXTO GERAL

Os fármacos são substâncias químicas utilizadas com fins medicinais que são essenciais à saúde humana constantemente afetada por diversas enfermidades, desempenhando assim um importante papel tanto na prevenção quanto no tratamento de diversas doenças (LOBO *et al.*, 2010). Entretanto, o processo de desenvolvimento de fármacos não é uma tarefa simples, demandando bastante tempo e recursos financeiros (MOSSINGHOFF, 1999).

O custo associado ao desenvolvimento e produção de um novo fármaco pode chegar a bilhões de dólares (MONTANARI, 2001, SURESH, 2008). O valor associado à descoberta destes novos fármacos vem crescendo a cada ano, sendo que na última década estima-se que o custo para desenvolvimento e inserção de um novo medicamento no mercado tenha crescido em torno de 150% (O'SHEA, 2008).

O alto custo desse processo está associado a diversos fatores como: dificuldade em sintetizar os compostos de interesse, falhas existentes nas metodologias empregadas na descoberta de fármacos, testes clínicos, e deficiências nas abordagens tradicionais como o virtual-screening (VS), em que apesar de possibilitar a análise de milhares de moléculas de forma rápida e automatizada, ainda se trata de um meio caro devido à grande quantidade de material utilizado nos experimentos (MUEGGE, 2006; SHOICHET, 2004).

Como uma tentativa de reduzir os custos associados ao desenvolvimento de um novo fármaco, a indústria farmacêutica tem cada vez mais investido no uso de abordagens racionais para o planejamento de fármacos (MURRAY, 1990), com o

objetivo de eliminar da triagem os compostos com baixa probabilidade de sucesso no desempenho da função desejada (TONIATTI *et al.*, 2014). Dessa forma, as ferramentas computacionais estão cada vez mais presentes tanto na indústria quanto na academia, podendo ser aplicadas nos diversos estágios do processo.

Além disso, diversas metodologias podem ser aplicadas no processo de planejamento racional de fármacos por meio de ferramentas como o planejamento de fármacos assistido por computador, docagem molecular (DOC), além da predição de propriedades como biodisponibilidade, toxicidade, entre outras. Apesar de ferramentas poderosas, as técnicas computacionais precisam de avaliações rígidas quanto à qualidade dos resultados obtidos, uma vez que possuem algumas limitações como: a precisão dos dados experimentais, nível dos cálculos empregados, e dificuldades na modelagem de alguns tipos de interações, especialmente as intermoleculares.

No final do ano de 2019, foi reconhecido o SARS-CoV-2 (LIU *et al.*, 2020), um novo coronavírus (CoV), causando uma síndrome respiratória aguda grave (HOEHL *et al.*, 2020), e seu surto provocou uma pandemia conhecida como COVID-19 (ZHANG *et al.*, 2020), ocasionando uma grande preocupação para a população devido a elevada taxa de contaminação, capacidade de propagação e índice de letalidade (LI *et al.*, 2020; FAÍCO-FILHO, 2020).

Com o andamento da pandemia do COVID-19, podemos destacar a importância da ciência dos materiais, na busca por novas ferramentas e tecnologias para pesquisa de antivirais e desenvolvimento de tratamento para combater o SARS-CoV-2 (PAIXÃO *et al.*, 2020). Uma das formas de pesquisa é a realização de simulações de computador (LE BRIS, 2005) com dados relacionados, usando Modelagem Molecular (MM) (HINSEN, 2000; MORRIS, 2008) por meio de DOC e da Dinâmica Molecular (DM).

O DOC se destaca como uma ferramenta muito importante para prever a afinidade de uma molécula por outra, ou seja, uma biomacromolécula (GARCÍA-GODOY *et al.*, 2019; FAKIH, 2020). Embora as simulações de DOC sejam ferramentas muito úteis, elas carecem de informações sobre a dinâmica de biomoléculas e complexos de ligantes. Ao realizar simulações de DOC, o comportamento dinâmico de arranjos (DAS *et al.*, 2021) podem ser monitorados e sondados em diferentes escalas de tempo, permitindo estudos de movimentos internos rápidos e mudanças conformacionais lentas para processos complexos, como ligação de ligante a um sítio

ativo ou dobramento de proteína (DAS *et al.*, 2021; SETHI *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2020).

O número de aplicações de DOC em medicamentos está sempre aumentando e seria quase impossível nomear todas. Quando empregados em conjunto, os procedimentos *in silico* e experimentais oferecem conhecimento das características elaboradas do reconhecimento intermolecular, tornando tal procedimento geralmente uma boa prática na descoberta de agentes inibidores do vírus (KERETSU, 2020). Atualmente, o reaproveitamento de medicamentos é a maneira mais rápida e econômica de fornecer medicamentos eficazes para nossa doença pandêmica por coronavírus 2019 (COVID-19).

Neste estudo, realizamos uma triagem virtual para as estruturas da superfície do SARS-CoV-2 com os fármacos Rodatina, Scedapina e Cequinadolina A. As técnicas de DOC e DM foram realizadas neste trabalho a fim de demonstrar possíveis particularidades na interação com as macromoléculas, definir sítios de ligação e comportamentos variando com o tempo analisando os gráficos de desvio quadrático médio (RMSD) e as ligações de hidrogênio(HB's). Todas as simulações foram realizadas com base no modelo receptor + ligante (JOSHI *et al.*, 2020; SANTOS, 2019; GARG *et al.*, 2020), onde foram selecionadas cinco estruturas (E-pro, M-pro, S-gly, R-poly e PL-pro) do *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>) que foram utilizadas como receptores, enquanto os ligantes foram as moléculas destes três fármacos utilizados no tratamento da COVID-19.

Este trabalho visa esclarecer os modos de ligação e interação dos fármacos usados por um grande grupo de pacientes em todo o mundo e sua possível eficácia contra o vírus COVID-19, seja como opção profilática ou de tratamento. Também pretendia dar uma visão clara da relação estrutura-atividade (SAR) necessária para o futuro projeto de novos medicamentos direcionados à recém-emergida protease SARS-CoV-2 por químicos medicinais.

1.2. MOTIVAÇÃO

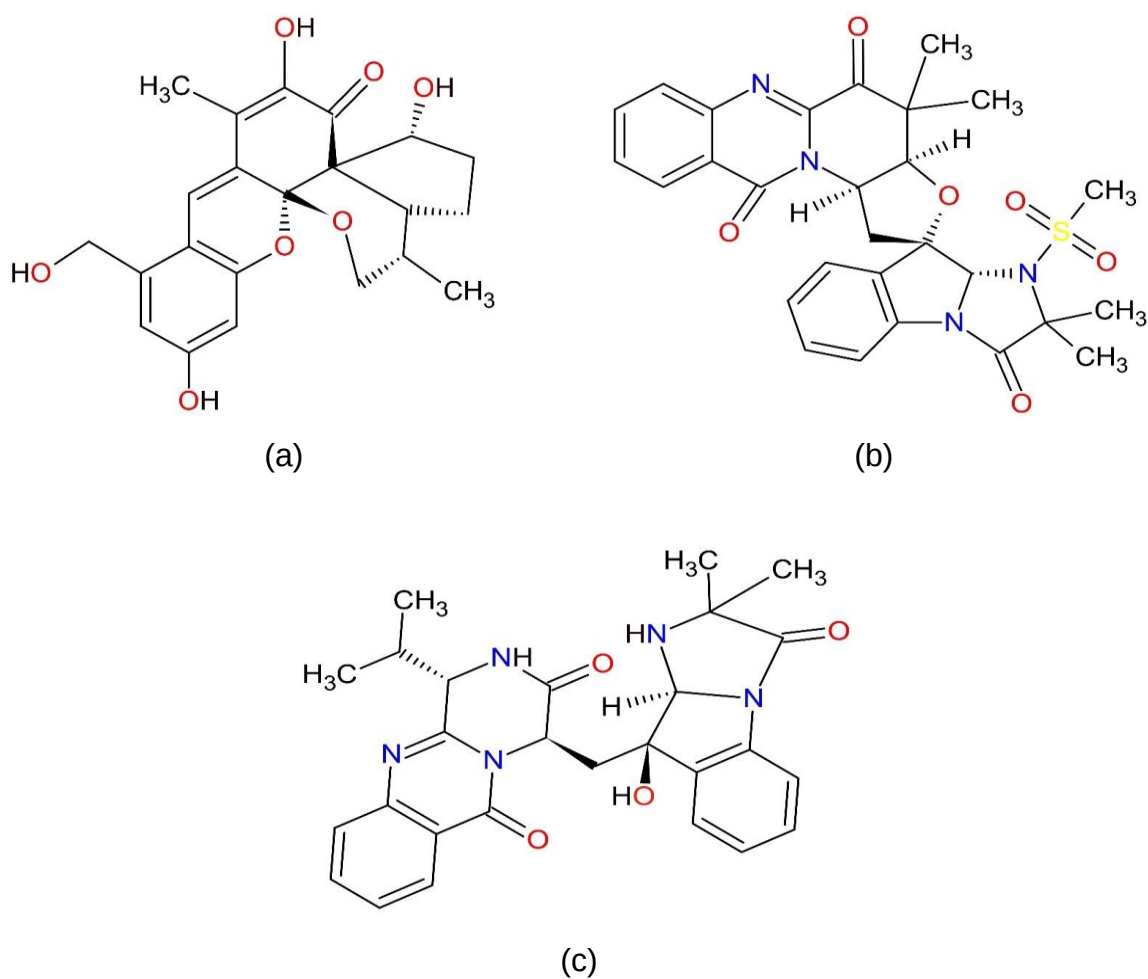
Esse estudo realizou uma análise do DOC com inibidores de protease do SARS-CoV-2, seguido por estudos de interação molecular por meio da DM, a fim de identificar quaisquer locais de ligação, interação e energias de afinidade. O planejamento de fármacos tem se tornado uma prática rotineira nos dias atuais. Do ponto de vista do planejamento, é importante destacar que, quando se fala do uso da

modelagem molecular, não se pretende chegar a uma molécula bioativa simplesmente através do uso de programas de computador. O processo de desenvolvimento dessas moléculas, devido à sua complexidade, envolve necessariamente o trabalho de uma equipe multidisciplinar, que emprega um grande conjunto de métodos computacionais de modo sistemático visando facilitar e otimizar o processo de desenvolvimento de compostos bioativos, em uma constante troca de informações com grupos de síntese química e avaliação da atividade destes compostos.

Esses métodos computacionais podem ser usados como ferramentas do planejamento racional de compostos, assim chamado porque é orientado por uma hipótese racional sobre o mecanismo de ação destes compostos. As técnicas de modelagem molecular visam monitorar e analisar essas interações e também prever interações ou estruturas desconhecidas de biomoléculas em interação. Portanto, é imperativo que o DOC combinado com a DM e outras técnicas computacionais, como a otimização de moléculas utilizando Teoria do Funcional de Densidade (DFT), fornecendo resultados confiáveis.

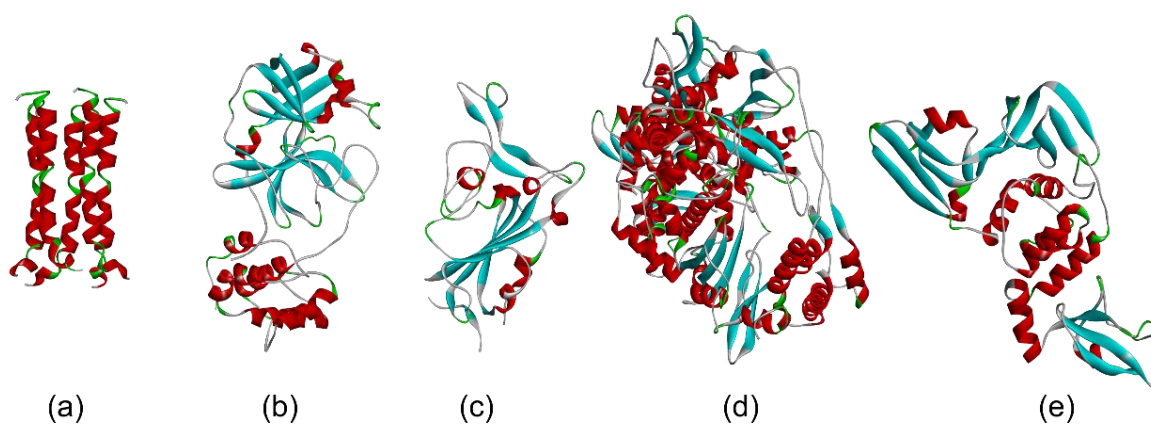
Visando a confiança destes resultados e na possibilidade de se obter possíveis fármacos inibidores do SARS-CoV-2, este trabalho se propõe a fazer uma análise da interação dos fármacos Rho, Sce e Seq (Figura 1) com as estruturas da superfície (E-pro, M-pro, S-gly, R-pol e PL-pro) dos SARS-CoV-2 (Figura 2).

Figura 1. Estrutura dos compostos em estudo: a) Rho, b) SceC e c) SeqA.



Fonte: O autor.

Figura 2. Macroestruturas utilizadas: a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-pol e) PL-pro.



Fonte: www.rcsb.org/pdb

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

Avaliar as interações de fármacos com potencial uso no tratamento da COVID-19 com as estruturas externas do SARS-CoV-2 por uma busca virtual na tentativa de analisar uma possível inibição ou inativação do vírus a fim de justificar o reaproveitamento dos fármacos em estudo.

1.3.2. Objetivos Específicos

- a) Otimizar as moléculas Rho, SceC e SeqA funcionalizando pelo método DFT;
- b) Otimizar os resíduos das proteínas E-pro, M-pro, S-gly, R-pol e PL-pro do SARS-CoV-2;
- c) Determinar o sítio ativo de interação entre a E-pro, M-pro, S-gly, R-pol e PL-pro do SARS-CoV-2 ao interagirem com Rho, SceC e SeqA por DOC por meio do Software Autodock Vina 4.0.2;
- d) Aplicar a DM aos complexos formados após a DOC, por meio do Software GROMACS 2021.2;
- e) Analisar o RMSD, para prever qual interação pode se estabelecer em relação ao tempo;
- f) Verificar a quantidade de HB's de cada simulação.

Apresentados esses elementos que justificam e norteiam o estudo, é pertinente também discorrer sobre o vírus SARS-CoV-2 e mais detalhadamente sobre Modelagem Molecular (MM), apresentando algumas definições e propriedades. Essa abordagem de revisão da literatura será realizada no capítulo seguinte.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão, é apresentada o entendimento atual da natureza do SARS-CoV-2 e da COVID-19; e uma abordagem sobre os fármacos e a aplicação de MM, a partir da DFT, DOC e DM.

2.1. A COVID-19 E O AGENTE CAUSADOR DA SARS-CoV-2

No fim de 2019, um novo CoV designado como SARS-CoV-2 surgiu na cidade de Wuhan, China, e causou um surto de pneumonia viral incomum. Por ser altamente transmissível, essa nova doença coronavírus, também conhecida como doença coronavírus 2019 (COVID-19), se espalhou rapidamente por todo o mundo, tornando-se uma pandemia global de forma que o surto contínuo de COVID-19 representa uma ameaça extraordinária à saúde pública global (FAN *et al.*, 2020; KANNAN *et al.*, 2020).

Liu *et al.* (2020), durante o surto de COVID-19, investigaram a natureza aerodinâmica do SARS-CoV-2 medindo o RNA viral em aerossóis em dois hospitais de Wuhan, indicando que o SARS-CoV-2 tem potencial para se espalhar por meio de aerossóis. Gotículas contendo vírus contaminam as mãos, as pessoas então entram em contato com as membranas mucosas da boca, nariz e olhos, causando infecção.

A COVID-19 foi rapidamente descoberta como sendo causada por um CoV posteriormente denominado síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (PARK, 2020), que pertence à família dos beta coronavírus. Pode haver a possibilidade de transmissão aérea em instalações de saúde devido a aerossóis gerados por procedimentos médicos. O SARS-CoV-2 é transmitido via fômites e gotículas durante o contato próximo e desprotegido entre o infectado e o não infectado.

O vírus também pode se espalhar por meio de transmissão por contato indireto. A transmissão do SARS-CoV-2 não se limita ao trato respiratório (CEVIK *et al.*, 2020). Alguns estudos demonstraram a transmissão por aerossol do SARS-CoV-2. A disseminação do COVID-19, a transmissão aerotransportada é a rota dominante. É o sétimo CoV conhecido a infectar humanos; quatro desses CoV (229E, NL63, OC43 e HKU1) (CEVIK *et al.*, 2020) causam apenas leves sintomas de resfriado comum.

2.1.1. Estrutura do SARS-CoV-2

Diferentes componentes estruturais formam a partícula viral (Figura 3), dentre os quais se destacam: uma molécula de RNA, o nucleocapsídeo, o envelope, proteínas de membrana, glicoproteínas Spike e o dímero hemaglutinina–esterase. O SARS-CoV-2 pertence ao grupo dos vírus envelopados, o que confere à partícula viral um formato esférico, que pode medir entre 100 e 125 nm. O envelope é constituído de diferentes elementos estruturais, tais como: lipídios, proteínas e carboidratos. As glicoproteínas S formam estruturas denominadas espículas com formato aparente de coroa, característica que deriva o nome coronavírus, que se projetam do envelope para o meio externo, e são fundamentais para a interação vírus-hospedeiro. Devido ao reconhecimento das espículas por receptores específicos, localizados na superfície da membrana plasmática da célula hospedeira, ocorre a fusão da partícula viral e a liberação do material genético do vírus no interior da célula (ROSSI *et al.*, 2020). Em síntese, este é o processo de invasão do coronavírus, abordado neste artigo a seguir.

O papel central das proteínas M é a montagem da partícula viral. A partir da interação com outras proteínas do envelope e com o RNA viral, a proteína M atua na regulação do tamanho e do formato da partícula. Além disso, ela está associada à aglutinação de fatores virais e de membrana da célula hospedeira a fim de conduzir o processo de produção de novas partículas durante a replicação viral (KIM, 2020).

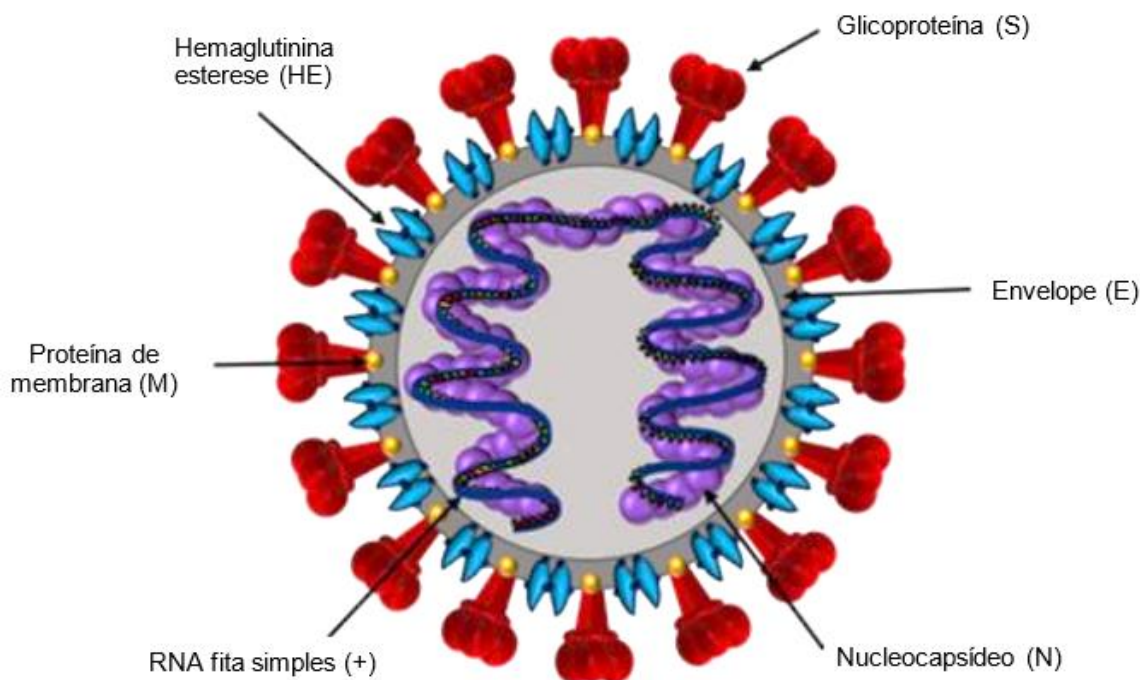
A proteína HE representa um outro grupo de proteínas incorporadas à estrutura do vírion, também relacionadas diretamente à patogênese viral (MAGRÌ *et al.*, 2021). Seu mecanismo de ação está intimamente ligado ao trato respiratório, realizando o reconhecimento do ácido siálico presente na membrana das células pulmonares. A HE também foi identificada em vários outros tipos de vírus, como o da gripe C, hepatite de camundongos (MHV), coronavírus bovino (BCV), dentre outros (NAKATSU *et al.*, 2018). Por fim, no interior da partícula viral está o material genético do coronavírus, associado às proteínas N, cuja função é proteger o genoma viral (ASHA, 2019).

As proteínas N formam um capsídeo cilíndrico e oco, composto por capsômeros que circundam o material genético do vírus e atribuem à molécula um formato helicoidal (SEYEDIN, 2021; PAN *et al.*, 2021). A infecção inicia-se com uma interação ligante-receptor, na qual a glicoproteína S se liga ao receptor da enzima 2 conversora de angiotensina (angiotensin converting enzyme 2 ou ACE-2) do hospedeiro (SHAHINSHAVALI *et al.*, 2020).

A glicoproteína S é constituída de duas subunidades, denominadas S1 e S2. A subunidade S1 contém um domínio de ligação ao receptor (receptor binding domain ou RBD) que se liga ao ACE-2, e é responsável por fixar o vírus à célula hospedeira; enquanto a subunidade S2 realiza a fusão da partícula viral com a membrana celular (BICKERTON *et al.*, 2018). Ambas SARS-CoV-2 e SARS-CoV ligam-se à mesma classe de receptor ACE-2, enquanto outras variantes de coronavírus podem reconhecer outros grupos proteicos. A MERS-CoV, por exemplo, reconhece o receptor DPP4 - Dipeptidil peptidase (PEREIRA, 2021), responsável por atuar diretamente na regulação hormonal e aumentar a produção e secreção de insulina (SVENDSEN, 2021).

O HCoV-229E reconhece o receptor da aminopeptidase N (APN), também conhecido como CD13, correspondente a um grupo de glicoproteína peptidase expresso na superfície das células renais, do intestino e do trato respiratório (SOLERTE *et al.*, 2020). Após o reconhecimento da ACE-2 as células alvo promovem a liberação de proteases em vias secretórias.

Figura 3. Viral do SARS-Cov-2 (S - glicoproteína de pico, E - proteína de envelope, M- proteína de membrana e N - nucleocapsídeo viral).



Fonte: Kleber, 2021.

2.1.2. Glicoproteína de pico

O CoV usa sua glicoproteína de pico (S), um alvo principal para o anticorpo de neutralização, para se ligar ao seu receptor e mediar a fusão da membrana e a entrada do vírus. Cada monômero da proteína S trimérica tem cerca de 180 kDa (CHI *et al.*, 2020) e contém duas subunidades, S1 e S2, mediando a ligação e a fusão da membrana, respectivamente. Na estrutura, as porções N- e C-terminais de S1 dobram-se como dois domínios independentes, domínio N-terminal (NTD) e domínio C-terminal (domínio C). Dependendo do vírus, o domínio NTD ou C pode servir como domínio de ligação ao receptor (RBD). Recentemente, relataram que o SARS-CoV-2 usa hACE2 como receptor (CHAN *et al.*, 2020).

As proteínas CoV S são proteínas de fusão viral classe I típicas, e a clivagem de protease é necessária para a ativação do potencial de fusão da proteína S23. Um modelo de clivagem de protease sequencial em duas etapas foi proposto para a ativação de proteínas S de SARS-CoV e MERS-CoV (Keretsu *et al.*, 2020; Joshi *et al.*, 2020), iniciando a clivagem entre S1 e S2 e ativando a clivagem no sítio S2' (ZHANG *et al.*, 2020). Dependendo das cepas de vírus e tipos de células, as proteínas CoV S podem ser clivadas por uma ou várias proteases do hospedeiro, incluindo furina, tripsina, catepsinas, protease transmembranar serina protease-2 (TMPRSS-2), TMPRSS-4 ou tripsina-like das vias aéreas humanas protease (HAT) (Joshi *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2019; Garg *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

A Glicoproteína de pico (S-gly) é uma estrutura grande, com comprimento em torno de 9 a 12 nm, sendo ela quem media a entrada do CoV nas células hospedeiras (TIAN *et al.*, 2021). As S-gly formam homotrímeros que se projetam da superfície viral, caracterizam por serem a porta de entrada dos CoV, portanto, é um alvo antiviral atraente. A S-gly é composta por duas subunidades funcionais, incluindo as subunidades S1 e S2. A subunidade S1 consiste no domínio N-terminal (NTD) e no domínio de ligação ao receptor (RBD). A função da subunidade S1 é ligar-se ao receptor na célula hospedeira. A subunidade S2 contém o peptídeo de fusão (FP), a repetição do heptal 1 (HR1), a hélice central (CH), o domínio conector (CD), a repetição do heptado 2 (HR2), o domínio transmembranar (TM) e a cauda citoplasmática (CT) (YI *et al.*, 2020).

A função da subunidade S2 é fundir as membranas dos vírus e células hospedeiras. O local de clivagem na fronteira entre as subunidades S1 e S2 é

denominado local de clivagem da protease S1 / S2. Para todos os CoV, as proteases do hospedeiro clivam a glicoproteína de pico no local de clivagem S2 'para ativar as proteínas que são críticas para fundir as membranas dos vírus e células hospedeiras por meio de alterações conformacionais irreversíveis. A disponibilidade dessas proteases nas células-alvo determina em grande parte se os CoVs entram nas células através da membrana plasmática ou endocitose. No entanto, se alguma dessas proteases pode promover a entrada do vírus SARS-CoV-2 permanece indefinida. Neste estudo, determinamos a suscetibilidade do tipo de célula, receptor do vírus, via de entrada e iniciação da protease para SARS-CoV-2 e identificamos vários alvos potenciais de drogas para SARS-CoV-2. Demonstramos neutralização cruzada limitada entre soros convalescentes de pacientes com SARS e COVID-19.

2.1.2.1. Protease principal

A principal protease membrana (M-pro), também conhecida como 3Clpro, é a principal protease codificada pelo SARS-CoV-2 (KUMAR, 2020). A M-pro é a mais abundante dos CoV, com um domínio do terminal NH₂ curto fora do vírus e um terminal COOH longo (domínio citoplasmático) dentro do vírus (HATTORI *et al.*, 2021). A M-pro é um importante componente que desempenha um papel destacável no tamanho, na forma e na manutenção do vírus, auxiliando na formação da S-gly, E-pro e N-pro e participa do processo de brotação (MAHANTA *et al.*, 2021).

A M-pro compõe a membrana do vírus, através de três transmembranas previstas em formato helicoidal. Seu papel é conduzir a estruturação de novos vírus dentro das células hospedeiras (BREIDENBACH *et al.*, 2021). A replicação do SARS-CoV-2 é mediada por um complexo formado por duas poliproteínas que são traduzidas do RNA viral. Essas poliproteínas são clivadas em pelo menos 11 sítios ao redor do C-terminal e da região central pela ação dos resíduos catalíticos na M-pro, liberando as proteínas vitais necessárias para a replicação viral (TRIPATHI *et al.*, 2020).

A M-pro do SARS-CoV-2 compreende três domínios; domínio I (resíduos 8–101), domínio II (resíduos 102–184) e domínio III (resíduos 201–303). Os dois primeiros domínios têm uma estrutura antiparalela β -barril, enquanto o terceiro, com cinco α -hélices, forma um conglomerado antiparalelo conectado ao domínio II por uma longa região de alça (resíduos 185-200) (MAHMUD *et al.*, 2021). A M-pro dos vírus SARS-CoV tem uma díade catalítica Cys-His (mostrada em preenchimento

sólido na Fig. 2a), com o local de ligação ao substrato localizado entre os domínios I e II. Um estudo anterior estabeleceu que CoV M-pro compartilha uma bolsa de reconhecimento de substrato estruturalmente altamente conservada, um alvo promissor para o design e desenvolvimento de drogas (NGUYEN *et al.*, 2020).

A recente descoberta de novos CoVs e os dados estruturais de CoV M-pro de diferentes cepas forneceram maneiras de examinar melhor isso. A superposição de 12 estruturas cristalinas de M-pro (SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-HKU1, BtCoV-HKU4, MHV-A59, PEDV, FIPV, 312 TGEV, HCoV-NL63, HCoV-229E e IBV) revelou que todos os CoV M-pros compartilham a mesma região de ligação ao substrato entre os domínios I e II como resultado da conservação da estrutura (DAI *et al.*, 2020).

2.1.2.2. Proteína Envelope

A proteína Coronavirus E é uma pequena proteína de membrana encontrada no envelope do vírus. Diferentes proteínas do coronavírus E compartilham semelhanças bioquímicas e funcionais impressionantes, mas a conservação da sequência é limitada. Neste relatório, estudamos a topologia da proteína E do novo vírus SARS-CoV-2 tanto em membranas microssomais quanto em células de mamíferos. Dados experimentais revelam que a proteína E é uma proteína de membrana de abrangência única com o terminal N sendo translocado através da membrana, enquanto o terminal C é exposto ao lado citoplasmático (Ntlum/Ctcty) (ZHENG *et al.*, 2021).

A topologia de proteína de membrana definida da proteína SARS-CoV-2 E pode fornecer uma estrutura útil para entender sua interação com outros componentes virais e do hospedeiro e contribuir para estabelecer a base para enfrentar a patogênese do SARS-CoV-2. A E-pro é uma pequena proteína de membrana integral envolvida em vários aspectos do ciclo de vida do vírus: formação, brotamento, envelopamento e patogênese (MANDALA *et al.*, 2020). A análise topográfica estrutural de superfície demonstrou que a mesma opera como um poro na membrana do vírus, canalizando íons e interagindo com as demais estruturas que compõem o vírus e as células hospedeiras (GUPTA *et al.*, 2021).

A E-pro possui em sua constituição uma transmembrana de domínio (TMD), capaz de oligomerizar outras proteínas, interagir com outras estruturas de E, formando

um canal iônico (RAHMAN *et al.*, 2021). Realiza interação por meio do terminal C com outra E-pro, além de interagir com a M-pro servindo de intermédio com o retículo endoplasmático de Golgi, chamado de ERGIC, iniciando assim o brotamento dos vírus nas células hospedeiras (HASSAN, 2020). A E-pro em um meio com pH variando entre 6,0 e 7,4, torna-se ativa, enquanto em pH entre 8,0 a 9,0, a atividade de E é reduzida. Dessa forma, fatores eletrofisiológicos, pode-se encontrar inibidores da E-pro, *in vitro*, sendo potenciais no tratamento contra o SARS-CoV-2 (TOTO *et al.*, 2020).

2.1.2.3. RNA polymerase (R-pol)

Compreender o funcionamento interno do vírus que causa a (COVID-19) pode nos ajudar a interrompê-lo. Yin *et al.* (2021), focado na polimerase viral essencial para a replicação do RNA viral, determinaram uma estrutura da polimerase ligada ao RNA e ao medicamento remdesivir (NAYDENOVA *et al.*, 2021). O remdesivir imita um bloco de construção de nucleotídeos de RNA e está covalentemente ligado ao RNA replicante, que bloqueia a síntese adicional de RNA. A estrutura fornece um modelo para projetar terapias aprimoradas contra a polimerase viral.

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita positiva. Sua replicação é mediada por um complexo de replicação e transcrição de múltiplas subunidades de proteínas virais não estruturais (nsps) (NARAYANAN, 2020). O componente central deste complexo é a subunidade catalítica (nsp12) de uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (PACHETTI *et al.*, 2020). Por si só, nsp12 tem pouca atividade e suas funções requerem fatores acessórios, incluindo nsp7 e nsp8, que aumentam a ligação e a processabilidade do molde RdRp.

A RdRp também é proposta como alvo de uma classe de drogas antivirais que são análogos de nucleotídeos; esta categoria inclui o remdesivir, que é um pró-fármaco que é convertido no fármaco ativo na forma de trifosfato [trifosfato de remdesivir (RTP)] dentro das células (SHANNON *et al.*, 2020). Como tal, RdRp tem sido objeto de intensos esforços de biologia estrutural. As estruturas de nsp7, nsp8 e o complexo de nsp12-nsp7-nsp8 foram determinadas (YIN *et al.*, 2021), fornecendo a arquitetura geral do complexo RdRp.

O esforço de descoberta de medicamentos é dificultado porque as estruturas do SARS-CoV-2 RdRp em complexo com um modelo de RNA e com inibidores de nucleotídeos não são conhecidas. Neste estudo, determinamos duas estruturas de microscopia crio-eletrônica (crio-EM) do complexo SARS-CoV-2 RdRp: uma na forma

apo e outra em um complexo com um RNA iniciador de modelo e o medicamento antiviral remdesivir (WANG *et al.*, 2021).

O RdRp do SARS HCoV é a cepa mais próxima do SARS-CoV2. Assim, o modelo SARS-CoV2 RdRp, composto por 801 aminoácidos, foi projetado usando o SARS HCoV RdRp como homólogo. O sítio ativo de RdRp é altamente conservado e contém resíduos de aspartato que se projetam da volta beta que une o $\beta 15$ e o $\beta 16$. Com um papel vital na replicação do genoma viral, os resíduos do sítio ativo de RdRp e a maior parte da região 5-Å ao seu redor são acessíveis à superfície e podem se ligar a nucleotídeos livres, incluindo ATP, GTP, CTP e UTP (MAIO *et al.*, 2021). Semelhante às proteases virais, o RdRp é considerado um alvo molecular para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o SARS-CoV2.

2.1.2.4. Papain like protease (PL-pro)

O SARS-CoV2 PL-pro é uma proteína multidomínio e é a maior unidade de replicase. É responsável pelas clivagens localizadas no terminal N da poliproteína replicase. Estruturalmente, ele compartilha 83% de identidade de sequência com PLpro do SARS-CoV (OSIPIUK *et al.*, 2021). A replicação do RNA genômico do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) é mediada por poliproteínas replicase que são processadas por duas proteases virais, protease semelhante à papaína (PLpro) e protease semelhante a 3C (3CLpro). Anteriormente, mostramos que o SARS-CoV PLpro processa a poliproteína replicase em três locais de clivagem conservados.

Aqui, relatamos a identificação e caracterização de um domínio de núcleo catalítico de 316 aminoácidos de PLpro que pode clivar eficientemente substratos de replicase em ensaios de clivagem trans e substratos peptídicos em ensaios de protease baseados em transferência de energia de ressonância fluorescente (GAO *et al.*, 2021). Realizamos análises de bioinformática em 16 domínios de protease semelhante à papaína de nove coronavírus diferentes e identificamos uma tríade catalítica putativa (Cys1651-His1812-Asp1826) e um sítio de ligação ao zinco.

Estudos de mutagênese revelaram que o Asp1826 e os quatro resíduos de cisteína envolvidos na ligação ao zinco são essenciais para a atividade do SARS-CoV PLpro. A modelagem molecular do SARS-CoV PLpro sugeriu que esse núcleo catalítico também pode ter atividade deubiquitinante. Testamos esta hipótese medindo a atividade deubiquitinante de PLpro por dois ensaios independentes (RUT *et al.*,

2020). O SARS CoV-PLpro hidrolisou os substratos diubiquitina e ubiquitina-7-amino-4-metilcumarina (AMC), e a hidrólise da ubiquitina-AMC é aproximadamente 180 vezes mais eficiente do que a hidrólise de um substrato peptídico que imita a sequência de reconhecimento da replicase Plpro (FREITAS *et al.*, 2020).

Para investigar os determinantes críticos reconhecidos por PLpro, realizamos mutagênese sítio-dirigida nos resíduos P6 a P2' em cada um dos três sítios de clivagem de PLpro. A PLpro reconhece a sequência de clivagem de consenso LXGG, que também é a sequência de consenso reconhecida por enzimas desubiquitinantes celulares (MOHAMUD *et al.*, 2021). Essa semelhança nos locais de reconhecimento do substrato deve ser considerada durante o desenvolvimento de inibidores de SARS-CoV PLpro.

2.2. A COVID-19 E O AGENTE CAUSADOR DA SARS-CoV-2

2.2.1. Fármacos Selecionados Para Estudo

2.2.1.1. Rodatina

Recentemente, um estudo apresentou o isolamento, a elucidação estrutural e a avaliação biológica de um candidato favorável para o tratamento de infecção por hepatite viral, o rodatina. O rodatina foi isolado do cogumelo *Rhodotus palmatus* como um óleo amarelo brilhante e sua fórmula molecular foi definida em C₂₃ H₂₆O₆ (SANDARGO *et al.*, 2019).

Outro estudo recente, selecionou 97 metabólitos secundários para avaliar a interação contra o Sars-CoV-2. Esses metabólitos são usados como inibidores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), do vírus do herpes simplex (HSV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da gripe e outras doenças. Entre esses metabólitos, o rodatina apresentou alguma interação com o vírus Sars-CoV-2 e despertou interesse em novas pesquisas (JIANG *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021).

O rodatina mostra fortes efeitos antivirais contra o vírus da hepatite C de maneira dose-dependente com um valor de IC₅₀ de 9,5 µM e fortes efeitos inibitórios a 40 µM sem qualquer efeito na viabilidade celular. O estudo sugere que o rodatina pode ser uma fonte altamente inovadora de medicamentos para o tratamento da infecção por hepatite C (SEVINDIK, 2021).

O cogumelo *Lentinus edodes* (TAKAHASHI *et al.*, 2021) é um alimento saudável popularmente consumido na China, Japão e outros países asiáticos; é conhecido por conter vários compostos bioativos em seus corpos de frutificação e micélios cultivados em líquido.

2.2.1.2. Scedapina C e Cequinadolina A

Outros potenciais fármacos para combater a COVID-19, são o Cequinadolina A e o Scedapina C. Alcalóides têm atraído atenção significativa de químicos e farmacologistas por sua diversidade em estruturas e amplo espectro de bioatividades. Ambos os compostos foram isolados do fungo marinho *Scedosporium apiospermum* que exibiram atividade antiviral significativa contra a hepatite C. Além disso, também mostraram ligações significativas com a protease 3CLpro do SARS-CoV2, responsável pela replicação viral (QUIMQUE *et al.*, 2021).

Isso mostra que esses compostos, são ativos contra uma variedade de vírus e apresentam potencial para serem desenvolvidos como agentes antivirais de amplo espectro - fornecendo proteção adicional contra doenças virais emergentes e reemergentes, como a COVID-19. Scedapina C é o primeiro exemplo de fumiquinazolina que contém um grupo aminosulfonil. Suas estruturas foram determinadas por HRMS, NMR, cálculos de ECD e análise de difração de cristal único de raios-X. As vias biossintéticas das fumiquinazolinas 1-18 foram propostas. Scedapina C (ASIF *et al.*, 2021) e Cequinadolina A (YUAN *et al.*, 2019) apresentaram atividade antiviral significativa contra a hepatite C.

As fumiquinazolinas (FQ) são um grupo de produtos naturais do patógeno humano *A. fumigatus* que exibem diversidade estrutural (YOUSSEF, 2021). Como o primeiro alcalóide indólico tripeptídeo caracterizado, o andaime tricíclico de FQ F é montado a partir de Ant, Trp e Ala pela ação enzimática de um NRPS trimodular em *A. fumigatus*. O agrupamento de genes FQ contém dois genes NRPS (af12080 e af12050) no cromossomo *A. fumigatus* Af293.125 O FQ mais simples é FQ F, que serve como um intermediário chave para fornecer alcalóides altamente complexos, como FQs A, C e D em *A. fumigatus* e triptoquialanina (TQ), uma toxina tremorgênica, em *Penicillium aethiopicum* (SHAKER *et al.*, 2021).

A Cequinadolina é uma fumiquinazolina e atua como antagonista seletivo do receptor de colecistocinina CCKA (GENTILE *et al.*, 2021) e tem sido usado como composto principal para o desenvolvimento de vários novos antagonistas da CCKA

com possíveis aplicações clínicas. O Cequinadolina A bloqueia a entrada viral nas células ao inibir glicosilação de receptores do hospedeiro, processamento proteolítico e acidificação endossomal (PETUSHKOVA, 2020). Esses agentes também têm efeitos imunomoduladores por meio da atenuação da produção de citocinas e inibição da autofagia e atividade lisossomal nas células hospedeiras (ROMEO *et al.*, 2021).

2.3. MODELAGEM MOLECULAR

2.3.1. DFT

A DFT (PANDIT *et al.*, 2021), é um dos métodos químicos quânticos, que permite calcular uma gama de propriedades por apresentar resultados teóricos próximos aos experimentais e muitas vezes permite compreender sobre a geometria, propriedades eletrônicas e espectroscópicas dos sistemas em análise, levando aos cálculos de propriedades moleculares. A DFT leva em consideração o conceito de funcional, que pode ser definido como uma função que depende de outra função. Neste caso, a energia da molécula é dada pelo funcional da densidade ρ (Eq. 2.1)

$$Energia = F[\rho(x, y, z)]. \quad (2.1)$$

A DFT busca encontrar o valor do funcional F. A teoria de Kohn-Sham, a qual descreve as densidades eletrônicas e suas subseqüentes correlações com energias moleculares, é dada na sua forma mais simples (Eq. 2.2) como

$$E_{DFT}[\rho] = T[\rho] + E_{ne}[\rho] + T[\rho] + E_x[\rho] + E_c[\rho], \quad (2.2)$$

Onde,

E: energia total,

T :energia cinética dos elétrons,

E_{ne} : energia de atração coulômbica núcleo-elétron,

J: energia de repulsão elétron-elétron,

E_x e E_c : correspondem, respectivamente, às energias de troca e correlação elétron-elétron.

Uma vez que cada termo da Eq. 2.2 é uma função da densidade eletrônica ρ , cada uma das energias T , E_{ne} , J , E_x e E_c é um funcional e sua determinação representa o desafio da teoria DFT. Os três primeiros termos podem ser obtidos razoavelmente bem utilizando métodos *ab initio* ou semi-empíricos (KROONBLAWD *et al.*, 2018). Porém, os termos de troca e correlação eletrônica são descritos de forma diferente na DFT. A maior fonte de erro em DFT está na natureza aproximada da energia de troca e de correlação (KE *et al.*, 2020).

Uma das aproximações usadas em essencialmente todos os métodos computacionais é a introdução de um conjunto base. Por isso, numerosos esquemas têm sido desenvolvidos para obter formas aproximadas do funcional para esta energia, sendo que atualmente ainda há esforços na busca por funcionais mais precisos para aplicação em áreas específicas. Em especial o funcional B3LYP, que é atualmente um dos funcionais de DFT mais utilizado e citado na literatura, é um funcional híbrido, com um sofisticado conjunto de bases que apresentam bom desempenho na obtenção de propriedades de moléculas formadas por carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio. Quanto melhor uma única função-base é para representar a função desconhecida, menos funções de base serão necessárias para atingir um dado nível de precisão. Neste trabalho utilizamos a função de base B3LYP / 6-31G (d,p).

2.3.2. DOC

A DOC é um método computacional que têm como principal objetivo prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas dentro do sítio ativo de um receptor de interesse, permitindo estimar a energia de interação a partir de funções de pontuação (ONAWOLE *et al.*, 2018), com base na afinidade de ligação, sendo esta energeticamente favorável (FRAU, 2018).

Os métodos de DOC para investigar a afinidade de ligação de moléculas com atividade biológica com seus receptores são compostos por dois componentes principais: o algoritmo de busca e a função de avaliação, responsáveis respectivamente por pesquisar diferentes conformações e orientações dos ligantes dentro da proteína alvo; e responsável por estimar as afinidades de ligação das conformações geradas, classificando-as e identificando o(s) modo(s) de ligação mais favorável do ligante ao receptor (SELWA *et al.*, 2018).

Tratando-se de uma metodologia computacional, o poder do processamento de dados tem sido essencial para cálculos mais complexos, e mais precisos, permitindo

desde uma descrição de complexidade maior do sistema ou mesmo a possibilidade de utilização de grandes bancos de dados, normalmente com milhões de compostos (JAYARAJ *et al.*, 2021).

Tendo em vista esses fatores, a descrição física do sistema deve encontrar um equilíbrio praticável entre acurácia e tempo computacional, o que representa um grande tema de estudo na área, abordando particularmente as funções de pontuação. A interação reversível entre um ligante e um receptor pode ser quantificada a partir da constante de ligação (K_A), expressa para um receptor (R), interagindo com um ligante (L) e resultando em um complexo ligante-receptor (RL), como mostrado nas Eq. 2.3 e 2.4:



$$K_A = \frac{[RL]}{[R][L]}. \quad (2.4)$$

A variação na energia livre devida à ligação (ΔG), ou simplesmente energia livre de ligação, está correlacionada à constante de ligação, como indicado na Eq. 2.5:

$$\Delta G = -RT \ln K_A, \quad (2.5)$$

onde,

T: temperatura, K

R: constante dos gases ideais, J/mol.K.

Nas simulações de DOC, almeja-se a avaliação de interações moleculares de forma a estimar ΔG , permitindo assim um ranqueamento dos melhores ligantes dentro de um sistema de moléculas. A DOC Molecular surgiu nos anos 80 e tornou-se uma das principais ferramentas na área de planejamento de fármacos, sendo um dos métodos baseados na estrutura mais utilizados na identificação da conformação de pequenas moléculas ligantes no sítio ativo do alvo (SLEDZ, 2018).

Sua capacidade e velocidade em realizar a triagem de grandes bibliotecas de compostos e identificar potenciais compostos que possam ou não modular a função

biológica das enzimas ou proteínas receptoras a torna uma técnica muito importante para a triagem virtual, cuja utilização tem crescido a cada ano em função das reduções de custos e tempo quando comparado a triagem experimental (GURUNG *et al.*, 2021).

A DOC originalmente baseia-se no conceito ‘chave e fechadura’ e consiste numa metodologia para a predição das conformações e orientações dos ligantes com um sítio de ligação alvo normalmente utilizados nos estudos de modelagem estrutural e predição da atividade (SCHWALLER *et al.*, 2019).

A DOC também pode ser utilizada em estudos envolvendo eventos moleculares cruciais como, os modos de ligação do ligante e suas correspondentes interações intermoleculares que estabilizam o complexo receptor-ligante, assim como, previsões quantitativas das energias de ligação, fornecendo uma classificação dos compostos com base na afinidade de ligação dos complexos receptor-ligante (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Para se compreender a maioria dos mecanismos e processos celulares é necessário determinar e compreender o modo de interação entre macromoléculas ou entre uma macromolécula e uma pequena molécula ligante, que pode atuar como agonista/antagonista ou substrato/inibidor em determinado processo fisiológico (ISLAM *et al.*, 2021). Neste sentido a técnica computacional denominada atracamento molecular, dedicada à previsão do modo de ligação e dos detalhes do reconhecimento molecular proteína-proteína e receptor-ligante, assume cada vez mais papel de destaque em pesquisa associadas à saúde e à biotecnologia.

Diante desta necessidade de exploração do espaço conformacional e precisa predição das afinidades de ligação, os softwares de DOC acabam apresentando aos seus usuários o dilema da escolha entre precisão dos resultados e velocidade do algoritmo utilizado. A amostragem conformacional é um desafio para a DOC proteína-ligante devido à complexidade de amostrar exaustivamente as possíveis mudanças na orientação e conformação relativa do ligante, assim como mudanças conformacionais da proteína.

Os métodos de DOC normalmente tratam a flexibilidade do ligante e da proteína de formas diferentes, uma vez que o tamanho e o número de graus de liberdade em uma proteína acabam por tornar está uma das questões mais desafiadoras para a DOC molecular. Deste modo, a capacidade de um algoritmo em lidar com a flexibilidade molecular intrínseca de um sistema e descrever de forma satisfatória as

interações proteína-ligante é um dos grandes desafios dos programas de DOC na atualidade em conjunto com as funções de pontuação (KITCHEN *et al.*, 2004).

A flexibilidade dos sistemas biomoleculares pode ser tratada de três formas em estudos de DOC: i) a proteína é considerada rígida e somente os graus de liberdade rotacionais e translacionais do ligante são explorados; ii) a proteína é considerada rígida e todos os graus de liberdade do ligante são explorados, ou iii) a proteína é considerada totalmente ou parcialmente flexível e todos os graus de liberdade do ligante são explorados (MOBLEY, 2009; GUEDES, 2013).

O método mais simples de ser aplicado é a DOC rígida, em que o algoritmo simplesmente explora os graus de liberdade translacionais e rotacionais, filtrando aqueles com baixa complementariedade antes de aplicar a pontuação final (BROOIJMANS, 2003). Neste tipo de DOC os ângulos e comprimentos de ligação permanecem fixos durante toda a simulação (SPERANDIO *et al.*, 2006).

A precisão desta abordagem reproduz resultados melhores para moléculas complexadas no sítio de ligação da proteína (TAYLOR, 2002). A DOC flexível permite que sejam feitas mudanças conformacionais no sistema, necessitando assim de muito mais recursos computacionais (TALELE, 2010). A escolha da abordagem empregada deve levar em conta a capacidade do hardware disponível, assim como, as características do sistema estudado (ACHARYA *et al.*, 2020). Apesar dos avanços nas metodologias de DOC molecular, a previsão de forma confiável das energias de ligação dos complexos proteína-ligante ainda é uma tarefa difícil (XIE *et al.*, 2021; TAO *et al.*, 2020).

A parametrização de forma eficiente destas funções de pontuações é uma tarefa bastante complexa, devido a uma série de fatores como aproximações matemáticas, dificuldade de parametrizar os termos e eventos moleculares (VUONG *et al.*, 2018; EMPEREUR-MOT *et al.*, 2020; MAFFUCCI *et al.*, 2018). Quanto maior o número de parâmetros físico-químicos avaliados, maior a precisão da função de pontuação, entretanto o custo computacional cresce proporcionalmente ao número de parâmetros, de modo que se deve buscar um equilíbrio entre o número de parâmetros avaliados e a velocidade do cálculo (AMARO *et al.*, 2018; ARIF *et al.*, 2021).

As funções de pontuação podem ser divididas em: baseadas em campo de força, empíricas, baseadas no conhecimento, e consensuais. As baseadas no campo de força estimam a energia de ligação por meio da soma dos termos de ligação e dos não-ligantes em uma função mestre (Bickerton *et al.*, 2018). As interações entre o

ligante e o receptor são mais frequentemente descritas utilizando os termos de energia de Van der Waals e os eletrostáticos (ALEKSANDROV *et al.*, 2018).

O termo de energia de Van der Waals é dado pelo potencial de Lennard-Jones e os termos eletrostáticos representados pela formulação coulômbica como uma função dielétrica dependente da distância (FATHOLLAHI-FARD *et al.*, 2019). Algumas das limitações das funções de pontuação baseadas no campo de força são: a não inclusão de termos entrópicos e de solvatação, além da necessidade de introduzir distâncias de corte para o tratamento das interações não-ligantes, o que dificulta um tratamento preciso dos efeitos de longo alcance envolvidos na ligação (ZHAN *et al.*, 2022; SPITALERI *et al.*, 2018).

WENG *et al.* (2020) avaliou a capacidade de predição das poses de ligação e classificação das afinidades de ligação para dez softwares de DOC moléculas, sendo cinco deles acadêmicos; AutoDock (NGUYEN *et al.*, 2019), AutoDock Vina (EBERHARDT *et al.*, 2021), LeDock (LIU, 2019), rDock (JIA *et al.*, 2021) e UCSF DOCK (KORYANOV *et al.*, 2019) e cinco comerciais; LigandFit (ÅGREN *et al.*, 2020), Glide (AROWOSEGBE *et al.*, 2020), GOLD (MIZDAL *et al.*, 2018), MOE (RADISAVLJEVIC *et al.*, 2020), DOCK (LIU *et al.*, 2020) e Surflex-Dock (HE *et al.*, 2021). Foram analisadas as docagens de três diferentes tipos de conformações (conformação original, rotacionada e otimizada) para os ligantes dos 2002 complexos estudados. GOLD e LeDock foram os que apresentaram os melhores resultados, 59,8% para as top poses e 80,8% para as best poses, respectivamente (XIE *et al.*, 2019). Além disso, observou-se que AutoDock, AutoDock Vina, LigandFit e GOLD são relativamente mais sensíveis as estruturas de partida dos ligante e que LeDock, rDock, UCSF DOCK, GLIDE, MOE Dock e Surflex-DOCK não são sensíveis as conformações de partida dos ligantes.

O GOLD foi o software que apresentou o melhor poder de amostragem para as melhores pontuações, entretanto não apresenta um bom poder de classificação para as melhores poses. Por fim, concluiu-se que nenhum programa de DOC possui ampla vantagem sobre os outros, sendo que a escolha do melhor software depende do sistema analisado.

O ADV consiste num conjunto de softwares livres com código aberto que podem ser utilizados para a DOC de pequenas moléculas em receptores macromoleculares. Ele pode ser usado para desde o estudo de interações e modos de interação de

sistema proteína-ligante, até a triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos (ISTYASTONO *et al.*, 2020).

O ADV possui uma série de ferramentas que podem ser utilizadas para aumentar a precisão dos resultados obtidos, como os métodos implementados para o tratamento da flexibilidade das cadeias laterais e tratamento explícito de águas estruturais (ZALEVSKY *et al.*, 2019). O software emprega um algoritmo de busca estocástico, em que o conjunto de conformações docadas são agrupadas de modo a permitir a análise da consistência dos resultados.

Resultados altamente agrupados indicam que o procedimento de busca conformacional é exaustivo o suficiente para garantir a cobertura de todo o espaço conformacional acessível. Devido à natureza estocástica da busca conformacional não é possível garantir a obtenção de um mínimo global para a solução encontrada, necessitando assim a realização de experimentos de reDOC para a validação do protocolo de DOC utilizado (SALAMAH, 2019).

2.3.3. Mapa de Potencial Eletrostático (MEP)

O MEP é um importante conceito que será explorado neste estudo é a correlação da atividade da estrutura dos inibidores estudados através das características do MEP. É de fundamental importância que a visualização do MEP forneça informações qualitativas sobre as moléculas, tais como o comportamento da interação entre um ligante e o receptor. Para os compostos estudados, os valores V foram calculadas pela equação abaixo:

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_i}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r')}{|r' - r|} dr', \quad (2.6)$$

onde,

Z_i : carga do núcleo A, localizada em R_A ;

$\rho(r')$: função da densidade eletrônica da molécula;

r' : variável de integração simulada.

O potencial eletrostático é uma propriedade local tridimensional que pode ser avaliada em qualquer ou todos os pontos r no espaço de um sistema. É bastante comum calcular e mostrar em uma grade espaçada cobrindo uma superfície externa

tridimensional da molécula (WILLIAMS *et al.*, 2021). O MEP tem sido empregado na caracterização de várias propriedades de sistemas químicos e biológicos (MALLON *et al.*, 2018).

O potencial eletrostático é uma grandeza quântica bem definida (LIU *et al.*, 2021). Também pode ser explorado experimentalmente por meio de Investigações de difração de raios-X (LI *et al.*, 2020). Além da definição rigorosa, uma vantagem da aplicação do potencial eletrostático molecular é a possibilidade de caracterizar propriedades locais (ou sítios) avaliando valores de MEP em pontos particulares do espaço molecular. Tem sido demonstrado em várias aplicações (GORZKIEWICZ *et al.*, 2019) que os valores de MEP fornecem uma abordagem para quantificar a reatividade em posições especificadas em uma molécula, tanto para interações intermoleculares (por exemplo, ligações de hidrogênio) quanto para reações químicas. Interpretações alternativas do MEP na análise da natureza dos efeitos dos substituintes em sistemas aromáticos (XU *et al.*, 2018) nos levaram a investigar a relação entre as propriedades e os valores do MEP em detalhes. No entanto, verificou-se que, para grupos fortemente doadores de elétrons e receptores de elétrons, os efeitos de ressonância contribuem para a influência geral dos substituintes.

Os autores (OLIVER *et al.*, 2018) corretamente se opuseram à interpretação de que as mudanças no MEP em posições específicas surgem de variações nas densidades eletrônicas locais. De fato, por definição, os valores de MEP dependem, de maneira complexa, das cargas positivas de todos os núcleos e de toda a densidade eletrônica (LIU *et al.*, 2018).

A ligação entre os valores de MEP e as cargas locais só pode ser qualitativa e aplicável a casos em que a distância entre o grupo substituinte e um determinado centro de reação é considerável (por exemplo, para posições meta e para em benzenos substituídos ou para centros de reação fora do anel aromático em derivados dissustituídos). O papel das contribuições locais de carga, em particular, a variação na densidade eletrônica causada pelos substituintes distantes.

A extensão em que esta hipótese se sustenta em sistemas aromáticos particulares pode ser julgada a partir das relações entre os valores de MEP e quantidades teóricas ou experimentais alternativas, que são conhecidas por depender da variação das cargas locais. Por definição, as constantes substituintes experimentais (GUO, 2021) referem-se às propriedades locais das diferentes posições

do anel (LI *et al.*, 2021). Boas correlações entre as reatividades do site e os valores de MEP podem ser considerados como uma indicação de uma contribuição dominante das variações de carga local nos deslocamentos de MEP nas respectivas posições antes do DOC.

2.3.4. DM clássica

A Simulação de DM é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas (HOLLINGSWORTH e DROR, 2018). No planejamento racional de fármacos baseado em estrutura, o fortalecimento da abordagem de planejamento baseado no mecanismo de ação pretendido as simulações de DM têm contribuído exaustivamente em diversas etapas do processo (ŚLEDŹ e CAFLISCH, 2018).

Os métodos de DM são fundamentados nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (PHILLIPS *et al.*, 2020). Afim de se obter particularidades dos movimentos microscópicos de interesse, a aplicação da mecânica estatística se faz necessária, a qual tem a função de calcular propriedades observáveis macroscópicas tais como: pressão, energia interna, volume, temperatura, entropia e energia livre a partir de outras microscópicas.

Baseado na Mecânica Molecular (MM) (WANG *et al.*, 2019), as moléculas são tratadas como um conjunto de átomos descritos por forças newtonianas. O conjunto dos potenciais de interação entre as partículas é referido como “campo de força” (LIU *et al.*, 2018). O campo de força empírico é uma função energia potencial total do sistema, o qual $V(r)$, é calculada 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 e os termos para átomos não ligados como, interações de van der Waals e de Coulomb. O campo de força empírico é representado pela Equação 2.7:

$$V(r) = \sum V_l + \sum V_\theta + \sum V_{vdW} + \sum V_{elet}, \quad (2.7)$$

onde, V_l é a energia de estiramento da ligação em relação a seu valor de equilíbrio (ou ideal), V_θ é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_ϕ é a energia devido à torção em torno de uma ligação V_{vdW} ,

representa a energia das interações de van der Waals e V_{elet} representa as energias de atração ou repulsão eletrostática.

O modelo utilizado para representar os potenciais harmônicos devido às oscilações dos comprimentos e ângulos de ligação com relação aos valores de equilíbrio é a utilização da Lei de Hooke, mostrada nas Equações 2.8 e 2.9:

$$V_l = k_l(l - l_0)^2, \quad (2.8)$$

$$V_\theta = k_\theta(\theta - \theta_0)^2, \quad (2.9)$$

onde l e θ são os comprimentos e ângulos de ligação, l_0 e θ_0 são os condizentes com os valores de equilíbrio e k_l e k_θ as constantes de força para os valores de equilíbrio. A forma funcional padrão para representar o potencial de energia para uma torção está mostrada na Equação 2.10:

$$V_\phi = \frac{V_n}{2}(1 + \cos(n\phi - \gamma)), \quad (2.10)$$

onde V_n é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, ϕ é o ângulo diedro e γ é o ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $\phi = 0$) (SK *et al.*, 2021). O valor de n dependerá do tipo de torção considerada. As interações entre pares de átomos não-ligados covalentemente (i, j) são descritas por potenciais compostos pelos termos de Van der Waals e eletrostático, representados respectivamente pelos potenciais de Lennard-Jones (Equação 2.11) e de Coulomb (Equação 2.12).

$$V_{vdW} = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (2.11)$$

$$V_{elet} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}}. \quad (2.12)$$

Na Equação 2.11, ε_{ij} é a profundidade do potencial entre a barreira atrativa e a repulsiva, e σ_{ij} é a distância finita na qual o potencial interpartícula é zero. No caso

das interações eletrostáticas (Equação 2.12), q_i e q_j correspondem à significância das cargas pontuais particulares dos átomos, r_{ij} a distância entre as cargas, ε_0 a permissividade do espaço livre e ε_r a constante dielétrica relativa do meio.

Os campos de forças existentes foram desenvolvidos de maneira independente e com todos os conjuntos de parâmetros específicos. Alguns incluem outros termos para descrever especificamente as ligações de hidrogênio ou para acoplar oscilações entre ângulos e comprimentos de ligação, com o objetivo de se obter uma melhor concordância com espectros vibracionais (ANDERS *et al.*, 2004).

Várias otimizações de métodos de DM foram realizadas e estão implementadas em vários pacotes de programas de modelagem molecular. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de força mais utilizados são CHARMM (ADAMS *et al.*, 1991), GROMOS (MICAELLO *et al.*, 2006), AMBER (WANG *et al.*, 2004), OPLS, (SHIVAKUMAR *et al.*, 2010), CVFF (LANGE *et al.*, 2016), entre outros.

As simulações de permitem que átomos e moléculas interajam por um período fixo de tempo, permitindo observar a evolução dinâmica do sistema. As versões mais comuns de trajetórias são determinadas pela resolução numérica das equações de movimento de Newton, que pode ser descrita para um sistema atômico simples pela Equação 2.13:

$$F_i(t) = m_i a_i, \quad (2.13)$$

$$F_i(t) = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i}, \quad (2.14)$$

onde F_i é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . Quando o campo de força é determinado é possível calcular as forças que atuam sobre cada átomo, calculando-se a derivada primeira da energia potencial, advinda do campo de força escolhido, em relação às posições desses átomos.

A Equação 2.14 gera diretamente a aceleração da partícula. A partir desta, integrando-se as equações de movimento, pode-se obter as velocidades, cuja integral, por sua vez, nos dá a mudança de posição do átomo. A integração das equações de movimento é realizada através de algoritmos baseados nos métodos das diferenças finitas, nos quais a integração é dividida em pequenos intervalos de tempo

Δt , permitindo simular os movimentos de maior frequência do sistema, que muitas vezes são as vibrações das ligações.

O algoritmo de Verlet (GRUBMÜLLER *et al.*, 1991) reduz o nível de erros no cálculo da próxima posição de um corpo, a partir da posição anterior, sem uso da velocidade, que utiliza as posições e acelerações dos átomos no tempo t e as posições do passo anterior, $r(t - \Delta t)$, para determinar as novas posições no tempo $t + \Delta t$, de acordo com a Equação 2.15:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t)\Delta t^2. \quad (2.15)$$

Este algoritmo pode ser obtido através da expansão da série de Taylor, inicialmente para frente (Equação 2.16) e depois para trás (Equação 2.17). Somando-se as duas e isolando $r(t + \Delta t)$, chega-se à Equação 2.15.

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 + \dots \quad (2.16)$$

$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 - \dots \quad (2.17)$$

Nos métodos de DM, existe uma grande família de algoritmos, cujo principal objetivo é aproximar o valor de uma dada integral definida de uma função sem o uso de uma expressão analítica para a sua primitiva, tais como o algoritmo de Beeman (AMINI e FINCHAM, 1990) e o método leap-frog (AMINI *et al.*, 1987).

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 procedimento básico consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce, de maneira que o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo.

O sistema minimizado possui forças pequenas sobre cada átomo e serve, portanto, como estrutura de partida para iniciar as simulações de DM. Os algoritmos de minimização mais conhecidos são: o método steepest descent (MIRON e

FICHTHORN, 2005), o método dos gradientes conjugados (FATTEBERT e GYGI, 2006) e o método de Newton-Raphson (AKRAM e ANN, 2015).

O método *steepest descent* se utiliza da derivada primeira, para determinar a direção para o mínimo. A técnica de gradientes conjugados utiliza informação das prévias derivadas primeiras para determinar uma direção ótima da busca. O método de Newton- Raphson usa tanto as derivadas primeiras quanto as segundas da função, utilizando não só as informações do gradiente como a curvatura para predizer onde a função mudará a direção ao longo do gradiente. 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 através de uma distribuição de Maxwell-Boltzmann.

Em estudos de DM pode-se também fazer o calculo da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) (YUSUF *et al.*, 2008; KIRCHMAIR *et al.*, 2008; SARGSYAN *et al.*, 2017; SCHREINER *et al.*, 2012) durante a trajetória de simulação, avalia-se assim a oscilação do sistema durante o tempo decorrido de uma determinada dinâmica. O RMSD é uma medida de similaridade amplamente utilizada na análise de estruturas e dinâmicas macromoleculares. Esta média é de grande importância, pois pequenas oscilações de RMSD correspondem a posições de equilíbrio do sistema, enquanto mudanças bruscas na média denotam mudanças importantes na conformação e instabilidade da interação molecular de determinada molécula. A equação 2.18 denota o RMSD de um sistema.

$$RMSD = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [r_i(t) - r_i(0)]^2 \right]^{1/2}, \quad (2.18)$$

onde $r_i(t)$ e $r_i(0)$ são as coordenadas do i -ésimo átomo no tempo t e 0, respectivamente, e N é o número de átomos no domínio de interesse (geralmente C α ou átomos da cadeia principal) onde são as coordenadas do i -ésimo átomo no passo de tempo j , suas posições médias e t é o tempo de simulações, expresso como o número total de passos de tempo coletados.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGIA DA PESQUISA

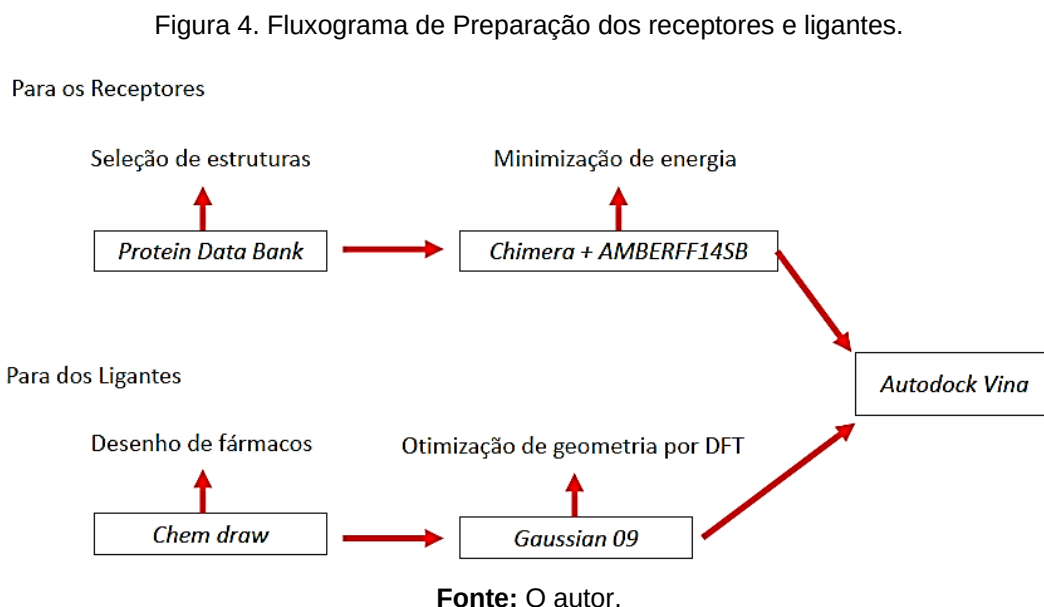
O capítulo anterior introduziu de maneira mais abrangente alguns pontos abordados neste estudo, para a utilização da DOC e da DM. Neste capítulo, serão abordados, de maneira mais específica, alguns aspectos relacionados à metodologia utilizada na pesquisa, apresentando os recursos computacionais, bem como a teoria que subsidia esse tratamento.

3.1. DOC

O DOC é uma ferramenta muito importante para prever a afinidade de uma molécula por outra. Para a análise das interações dos fármacos em estudo com as estruturas da superfície dos SARS-CoV-2, citadas anteriormente, utilizamos o software Autodock Vina 4.2 (ADV). A função de pontuação do ADV se aplica a todos os átomos do ligante e da proteína. A seguir é mostrado os atributos adotados para realizar o DOC, desde a preparação do alvo e do ligante até o protocolo de encaixe entre ambos no ADT.

3.1.1. Preparação dos receptores e ligantes

A Figura 4 ilustra o fluxograma de Preparação dos receptores e ligantes.



Todas as simulações foram realizadas com base no modelo receptor + ligante (LI *et al.*, 2021), onde foram selecionadas cinco estruturas (E-pro, M-pro, S-gly, R-poly e PL-pro) do Protein Data Bank, que foram utilizadas como receptores, enquanto os ligantes foram as moléculas de três fármacos utilizados no tratamento da COVID-19.

As estruturas dos receptores foram otimizadas utilizando o software Chimera 1.15.6 (CHM) (PEDREGAL, 2018) a fim de encontrar as condições ideais que satisfizeram os vários alvos predefinidos, a complexidade adicional surge para tarefas que envolvem experimentação ou cálculos computacionalmente (VLASIOU, 2021). Utilizamos o CHM como uma função escalar de realização de propósito geral para otimização de múltiplos alvos, onde as avaliações são o fator limitante o seu desempenho foi bem estabelecido usando diferentes algoritmos de otimização, nesse sentido utilizamos o campo de força AMBERFF14SB (ZHOU *et al.*, 2021), a fim de obter a estrutura com a melhor conformação baseada no conjunto, onde também calculamos suas cargas potenciais eletrostáticas restritas (RESP) (BAYLY *et al.*, 1993). Nesta etapa, também foi utilizado o modelo contínuo polarizável (PCM) (SCALMANI, 2010).

Os ligantes foram selecionados especificando seu identificador no banco de dados PUBCHEM através do upload dos cinco ligantes, que foram otimizados pelo software Gaussian09W (G09W) (FRISCH, 2009) usando a DFT (MOHAMMAD *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2013; LI, 2011) com B3LYP funcional e 6-311 ++ (d, p) (SAAD, 2017). Utilizamos a análise do MEP que permitem visualizar as distribuições de carga das moléculas e as propriedades relacionadas à carga das moléculas (RAMALINGAM *et al.*, 2012).

Usamos Gaussian 09 para calcular a energia potencial eletrostática a uma distância dos núcleos da molécula (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2014). Para analisar com precisão a distribuição de carga de uma molécula, uma enorme quantidade de valores de energia potencial eletrostática foi calculada. A maneira de transmitir esses dados é representá-los visualmente, como um MEP. A DOC foi realizada utilizando o software ADV. Nesta etapa, os ligantes foram considerados flexíveis, enquanto os receptores foram tratados como uma estrutura rígida. Nessas interações consideramos a mudança de energia de afinidade (kcal/mol). Porém, para os cinco ligantes investigados, 30 poses ao longo das macroestruturas foram geradas a partir do algoritmo genético de ancoragem do ADV (RENTZSCH, 2015), onde a melhor pose

para cada ligante (sistema de menor energia) (MORTAZAVI, 2017; BHARATHAM *et al.*, 2014) foi selecionada como a conformação a ser analisada.

O ADV avaliou a energia de afinidade entre proteína-ligante usando uma função de pontuação baseada no campo de força AutoDockZN (SANTOS-MARTINS *et al.*, 2014). Os modos de vinculação previstos podem ser visualizados online com um miniaplicativo embutido simples ou analisados em mais detalhes graças a uma integração perfeita com o visualizador molecular UCSF Chimera, com a ajuda da documentação online e da comunidade de usuários.

3.1.2. Protocolo de encaixe usado no ADV

Após os processos de otimização de ligantes e minimização de receptores, o acoplamento molecular foi realizado utilizando o pacote de software ADV e Autodock Tools (ADT). Todos os ângulos de torção nos ligantes foram relaxados, permitindo a execução de ancoragens flexíveis, enquanto os receptores permaneceram rígidos durante todo o processo. Com os hidrogênios polares adicionados aos receptores, o modelo de carga parcial dos átomos unidos de Kollman (NGUYEN *et al.*, 2019; MORRIS *et al.*, 1996) foi atribuído a ligantes e receptores. Aplicação de carga e seleção de hidrogênios polares (MUKUND *et al.*, 2019) no receptor e ligantes onde consideramos ligações de hidrogênio usuais e incomuns (THOMSEN, 2006).

Parametrizamos o grid box seguindo o potencial de Lennard-Jones (FORLI, 2007, EWING *et al.*, 2001) com fatores eletrostáticos e fornecendo valores para todos os átomos do receptor, o grid box para as simulações continha as seguintes dimensões: 49 Å × 29 Å × 54 Å, para E - pro, 60 Å × 48 Å × 43 Å, para M - pro, 62 Å × 56 Å × 49 Å para o S-gly, 71 Å × 58 Å × 66 Å, para R - pol, 50 Å × 30 Å × 38 Å, para PL - pro para as direções x, y e z respectivamente no local de conexão de cada uma das duas macromoléculas. A função empírica de energia livre e o algoritmo genético lamarckiano (LGA) (FUHRMANN *et al.*, 2010) foram utilizados para as simulações de ancoragem adotando os parâmetros mais utilizados.

A partir dos resultados obtidos no DOC, 30 principais conformações foram selecionadas usando o software para cada sistema ligante-receptor. Para cada sistema molecular, escolhemos a conformação de energia de afinidade (AE) com ligações quimicamente razoáveis (isto é, comprimentos adequados para ligações químicas). Mais tarde, essas poses foram usadas como conformações iniciais em simulações no processo de DM. Além disso, uma visualização 3D e resultados salvos

no formato PDBQT foram obtidos usando o software Discovery Studio Visualizer 3.5 (PAWAR, 2021).

3.2. MÉTODO DO MEP

Os MEPs permitem visualizar as distribuições de carga das moléculas e as propriedades relacionadas à carga das moléculas (MILLS, 2014). Também nos permite visualizar o tamanho e a forma das moléculas. Em química orgânica, MEPs são inestimáveis para prever o comportamento de moléculas complexas (BITENCOURT-FERREIRA, 2021). O primeiro passo envolvido na criação de um MEP é coletar um tipo muito específico de dados: energia potencial eletrostática (POLITZER, 2002).

Usamos Gaussian 09 para calcular a energia potencial eletrostática a uma distância dos núcleos da molécula (LEE, 1995). A energia potencial eletrostática é uma medida da força de cargas, núcleos e elétrons próximos em uma determinada posição. Para analisar com precisão a distribuição de carga de uma molécula, uma enorme quantidade de valores de energia potencial eletrostática deve ser calculada. A melhor maneira de transmitir esses dados é representá-los visualmente, como um MEP.

Os dados são calculados em um modelo de densidade eletrônica da molécula derivada da equação de Schrödinger (TOPPING, 1927). Para tornar os dados de energia potencial eletrostática fáceis de interpretar, um espectro de cores, com vermelho como o menor valor de energia potencial eletrostática e azul como o mais alto, é empregado para transmitir as intensidades variáveis dos valores de energia potencial eletrostática (POLITZER, 1985).

Os MEPs também ilustram informações sobre a distribuição de carga de uma molécula (WARSHEL, 1998). Os MEPs transmitem informações sobre a distribuição de carga de uma molécula devido às propriedades do núcleo e à natureza da energia potencial eletrostática (WALKER, 2021). Assim, um alto potencial eletrostático mostra a relativa ausência de elétrons e um baixo potencial eletrostático mostra uma abundância de elétrons. Essa propriedade dos potenciais eletrostáticos também pode ser extrapolada para as moléculas.

3.3. PROTOCOLO PARA SIMULAÇÕES DM

As simulações DM dos fármacos ligados a macromoléculas de superfície SARS-CoV-2 foram realizadas usando o campo de força CHARM36 (Schreiner *et al.*, 2012) conforme implementado no GROMACS versão 2021.2 (PÁLL *et al.*, 2020) em uma solução aquosa explícita. A caixa foi preenchida com moléculas de água de carga de ponto único (SPC) (PATRA e KARTTUNEN, 2004). Íons de sódio e cloreto também foram adicionados ao sistema. As estruturas iniciais retiradas do processo de DOC foram posteriormente minimizadas em termos de energia com um método de descida mais íngreme.

Os resultados desta minimização produziram as estruturas iniciais para as simulações MD. Cada sistema continha uma média de cerca de 13.000 átomos no total. As simulações DM foram então realizadas com um número constante de partículas, pressão e temperatura, configuração NPT e NVT (FERNÁNDEZ-PENDÁS *et al.*, 2014). O algoritmo SETTLE (LEMKUL *et al.*, 2015) foi usado para restringir o comprimento de ligação e o ângulo das moléculas de água. As interações eletrostáticas de longo alcance foram calculadas usando o método Particle-Mesh-Ewald (PME) (YAN *et al.*, 2020). Uma pressão constante de 1 bar foi aplicada, moléculas de água e íons foram acoplados separadamente a um banho a 303 K com uma constante de acoplamento de 0,1 fs. Cada simulação foi executada por 100 ns e os sistemas foram balanceados nos primeiros 5 ns.

A análise das trajetórias e estruturas simuladas foi realizada com as ferramentas embutidas do programa GROMACS 2021.2. O método PME foi aplicado para calcular as interações eletrostáticas e o algoritmo de gradiente conjugado e foi usado para restringir as ligações covalentes envolvendo hidrogênio. Utilizando a ferramenta CPPTRAJ (ROE e CHEATHAM III, 2018), foi possível extrair as informações necessárias para a criação dos gráficos de RMSD e de ligações de hidrogênio no decorrer da simulação, tudo em função do tempo. Através do módulo TRJCONV (BAILDYA *et al.*, 2020), foram extraídas as informações necessárias para a criação de gráficos de valores de RMSD em função do tempo.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

No capítulo anterior abordamos a metodologia de pesquisa deste trabalho, mostrando as técnicas de DOC, MEP e DM a serem utilizadas. Neste capítulo seguinte apresentamos os resultados obtidos, juntamente com as discussões do mesmos.

4.1. DOC

4.1.1. Preparação Obtidos Pelo ADV

As interações demonstraram ligações muito próximas e essas possuem características atrativas, elas, portanto, podem permitir relacionar claramente que tais interações com as estruturas macromoleculares contribuíram para a formação de melhores associações, explorando as diferenças de eletronegatividade entre os átomos. As posições assumidas pelos ligantes no sítio ativo permitem interações com os aminoácidos presentes. Cada posição tomada pode levar a associações com diferentes aminoácidos locais. Quanto melhores forem as energias de ligação, mais fortes serão as interações que ocorrem entre as moléculas do ligante e os aminoácidos.

Dentre as posições testadas, as melhores energias de ligação provavelmente serão também as posições assumidas no ambiente biológico. A seguir, será apresentada a imagem com as posições da melhor energia de interação obtida para os dois ligantes com a melhor posição. O evento de ajuste está localizado em torno do domínio catalítico conhecido das estruturas cristalinas. Isso indica que a associação entre esses resultados de ancoragem e a eficácia do tratamento da COVID-19 tenha a possibilidade de ocorrer. Em conclusão, nossos resultados revelaram que os ligantes possuem interações fortes com as estruturas e podem ser potenciais agentes terapêuticos.

A partir dos cálculos de DOC, observou-se que os três ligantes apresentaram tendência de se ancorar nos sítios ativos das macroestruturas, indicando que essa região possui maior afinidade química por essas moléculas. Além disso, o procedimento de DOC permitiu identificar quais aminoácidos são mais favoráveis para realizar ligações químicas com os ligantes. Neste trabalho foram estudadas as

energias de ligação obtidas entre os fármacos. Algumas substituições na posição da estrutura de base foram realizadas com o objetivo de avaliar as energias de ligação para a proposição de uma melhoria na molécula do fármaco. As energias de ligação obtidas para os ligantes propostos indicam que o acoplamento contribui para uma efetiva melhora das energias de ligação com a proteína.

Para avaliar os resultados da DOC, é convencional utilizar a o valor de energia de afinidade mais baixo que pode criar uma melhor ligação entre o ligante e a proteína (BURGOYNE, 2006). Por outro lado, utilizamos a média ponderada de Boltzmann das energias de ligação para obter um resultado mais realista, uma vez que os estados com menor energia ocorrerão com maior probabilidade do que aqueles com maior energia em um sistema. Propomos que tal abordagem seja mais racional no que diz respeito à utilização da média padrão das pontuações de ligação ou à seleção da melhor pontuação de ligação.

Os dados indicam (Tabela 1) que a ausência de a SeqA demonstra maior possibilidade de interação em comparação com os outros compostos para todas as interações consideradas neste estudo. O ADV identifica automaticamente os locais de ligação em potencial (também chamados de cavidades ou locais ativos) usando seu algoritmo genético. No caso das estruturas cristalinas para os complexos o programa geralmente identificou locais diferentes de ligação de onde o menor valor de energia de afinidade foi obtido como melhor resultado.

Durante as simulações de DOC molecular analisamos quais regiões das macroestruturas foram mais favoráveis ao estabelecimento de ligações não covalentes com os ligantes. Observou-se que todos os ligantes possuem maior afinidade com sítio ativo dos receptores, indicando que essa região possui maior afinidade química. O DOC molecular elucidou a importância da flexibilidade da proteína na interação com o ligante e ajudou a explorar as interações entre esses que foram selecionados e apresentados neste trabalho. Apenas as conformações proteína-ligante com melhores pontuações nos resultados de DOC foram expostas e analisadas.

Os resultados das moléculas considerados como ligantes (Tabela 1) os quais foram acoplados a M-pro, E-pro, S-gly, R-poly e PL-pro. Os valores de energia de afinidade alcançados, são os resultados brutos originais da ferramenta de ajuste usada, representam os valores de energia de afinidade de ligação relativa. Dentre as simulações com os fármacos antivirais, o fármaco que apresentou a menor pontuação

de DOC, superando os demais resultados foi a SeqA com a maior parte das macroestruturas seguido do Sce. A SeqA obteve o menor valor de energia de afinidade na média entre todas as simulações. Este resultado sugere que esses compostos têm uma estrutura ancorada mais estável em comparação com outros candidatos a fármacos.

Tabela 1. Simulações de pontuação do ADV.

Complexos		Energia de afinidade (kcal.mol ⁻¹)
E-pro	Rho	-7,505
	SceC	-7,947
	SeqA	-8,186
M-pro	Rho	-7,453
	SceC	-7,427
	SeqA	-9,617
S-gly	Rho	-6,784
	SceC	-6,617
	SeqA	-7,866
R-pol	Rho	-7,783
	SceC	-7,945
	Rho	-7,505
PL-pro	Sce	-7,947
	SeqA	-8,186
	Rho	-7,453

A Figura 5 apresenta que a ancoragem molecular com o Rho, as interações se restringiram aos aminoácidos. A interação da E-pro com o Rho (Figura 5a) apresentou um total de seis interações do tipo alkyl, onde há interação da nuvem de elétrons sobre um grupo aromático e um grupo de elétrons de qualquer do grupo alkyl gerando ligações do tipo hidrofóbicas.

A Figura 5b mostra as interações com a M-pro, esta apresenta ligações convencionais de hidrogênio e entre carbono e hidrogênio foi observado que torna esta interação importante na organização de moléculas e acoplamentos de ligantes, como dobramento de proteínas e reconhecimento molecular. Uma descrição detalhada das ligações π e de hidrogênio está de acordo com a análise de

acoplamento, verificou-se que existe afinidade da ligação, o que pode indicar um grau de influência deste tipo de interação para a energia de afinidade. A parte central desse ligante obteve assim como as anteriores, interações intramoleculares tais conexões exibiram valores de energia mais favoráveis, principalmente na simulação com a S-gly que obteve interações do tipo Pi-anion . Isso porque esses grupos se adaptam melhor ao sítio do sítio ativo da proteína, facilitando a interação com os aminoácidos presentes.

No processo de DOC as moléculas de água e ligantes co-cristalizados foram removidos. O ligante foi preparado para acoplamento, minimizando sua energia no nível de teoria B3LYP / 6-31G. Entre as conformações acopladas do composto do título, a confirmação que estava perto da conformação do ligante co-cristalizado com boa pontuação foi visualizada para interações ligante-proteína no Discovery Studio Visualizer 4.5.

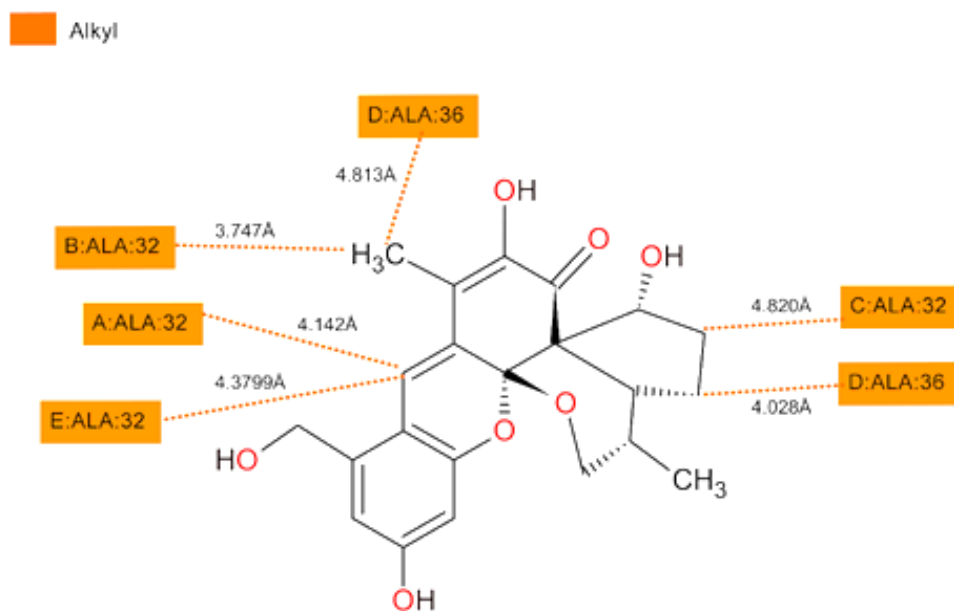
O ligante Rho se liga aos locais ativos das macro estruturas por meio de interações não covalentes fracas, sendo as mais proeminentes as interações de ligação do tipo alkyl, gerando ligações do tipo hidrofóbicas. O composto formou ligações de hidrogênio somente com a M-pro S-gly e R-poly, a presença deste tipo de interação se torna importante na organização de moléculas e acoplamentos de ligantes, como dobramento de proteínas e reconhecimento molecular.

Uma descrição detalhada das ligações π e de hidrogênio está de acordo com a análise de acoplamento, verificou-se que existe afinidade da ligação, o que pode indicar um grau de influência deste tipo de interação para a energia de afinidade. No sítio ativo da S-gly têm se uma ligação pi-anion com um dos anéis de benzeno monossustituídos da Glu 471, o inibidor forma um complexo estável com o a glicoproteína spike. Com base na pontuação de DOC do rodantina, estudos de interação e suas aplicações atuais para o provável tratamento COVID-19.

A fim de determinar a energia de ligação e adequação dos inibidores ao sítio ativo da enzima e para extrair seu sítio de ligação. Nossos dados (Tabela 1) indicaram que as energias de ligação da aptidão dos inibidores em relação ao rodantina apesar de baixa representam um fármaco como potencial inibidor para se ligarem ao sítio ativo da enzima portanto, poderia ser usado para um estudo comparativo. O ligante possui características hidrofóbicas ligante como um momento de dipolo dos inibidores, isso resulta numa interação eficaz. Como esperado, entre outros inibidores, o rodantina

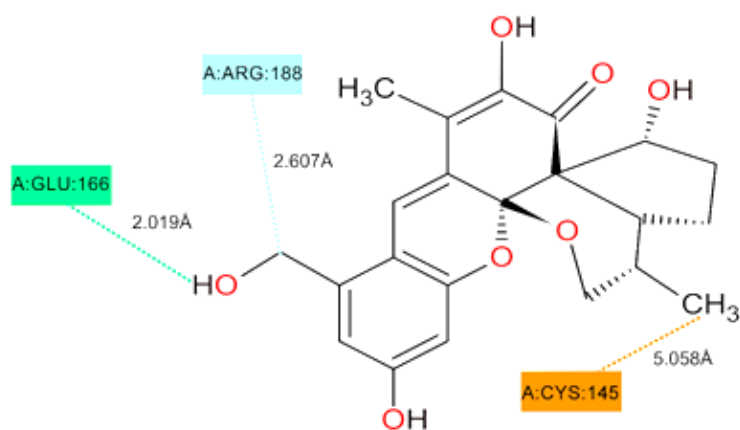
apresenta a maior energia de afinidade, o que reconfirma seu caráter de inibição eficiente.

Figura 5. Interações Rodatina-Macroestruturas, a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro.

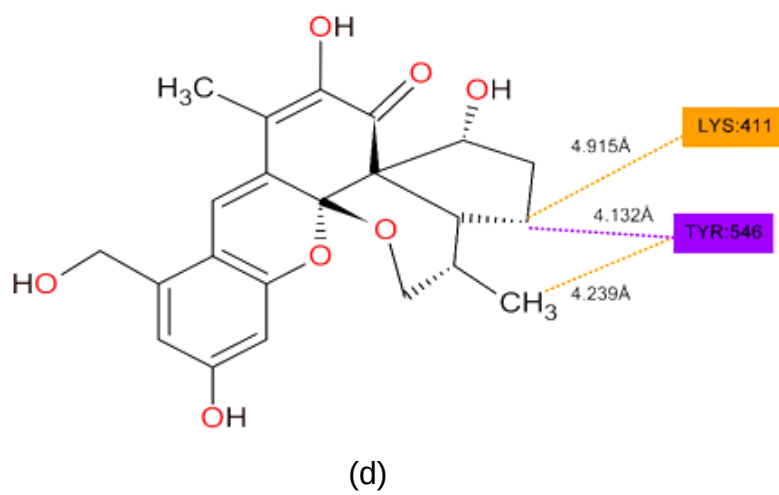
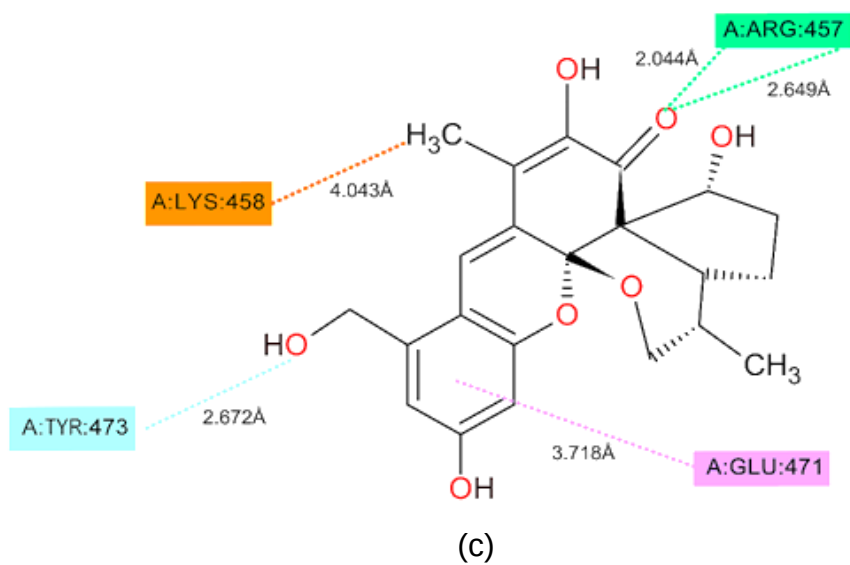


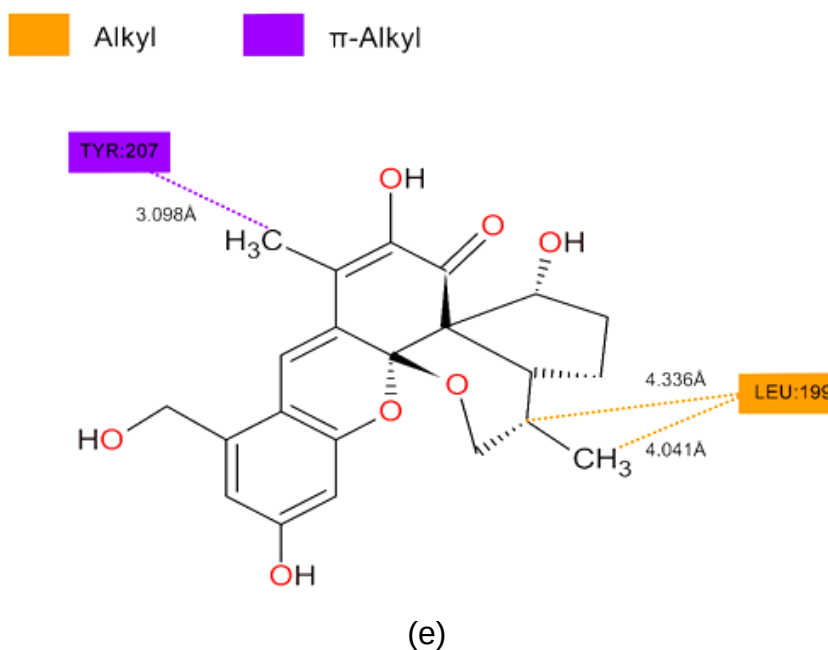
(a)

Carbon Hydrogen Bond Alkyl Conventional Hydrogen Bond



(b)





A Figura 6a apresenta que as conformações que o SceC obteve no sítio catalítico da E-Pro, as interações se restringiram aos aminoácidos. Na interação da com a E-pro ocorreram do tipo tipo π -Alkyl, Alkyl e π -sigma onde há interação da nuvem de elétrons sobre um grupo aromático e um grupo de elétrons de qualquer do grupo Alkyl gerando ligações do tipo hidrofóbicas. Houve interações de hidrogênio com M-pro, S-gly, R-poly e PL-pro, além de uma interação Carbon com a R-pol que é ligação covalente, o que significa que o carbono compartilha seus elétrons de valência externos.

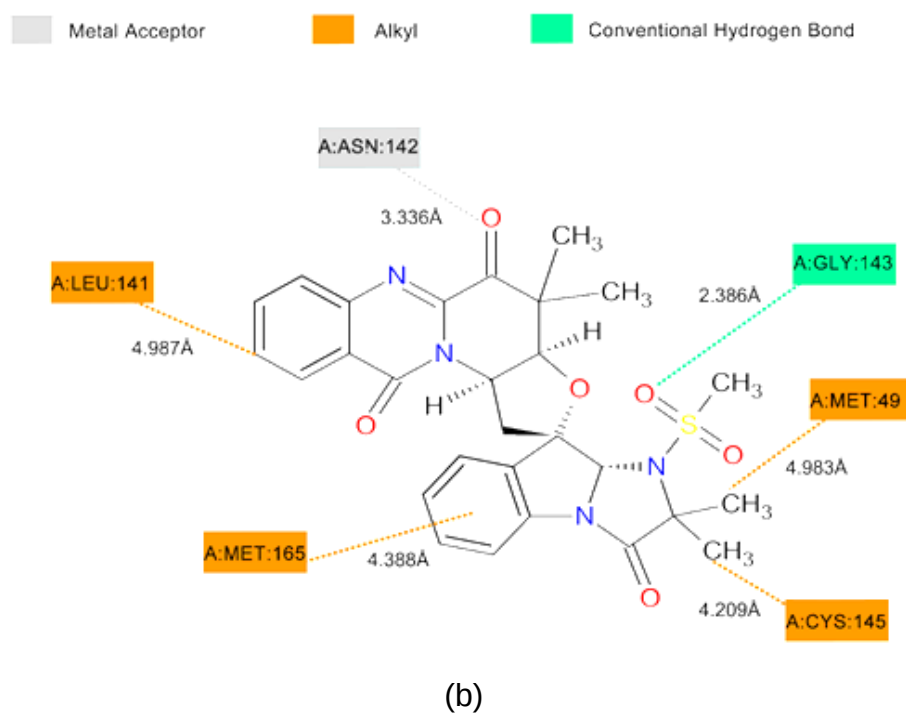
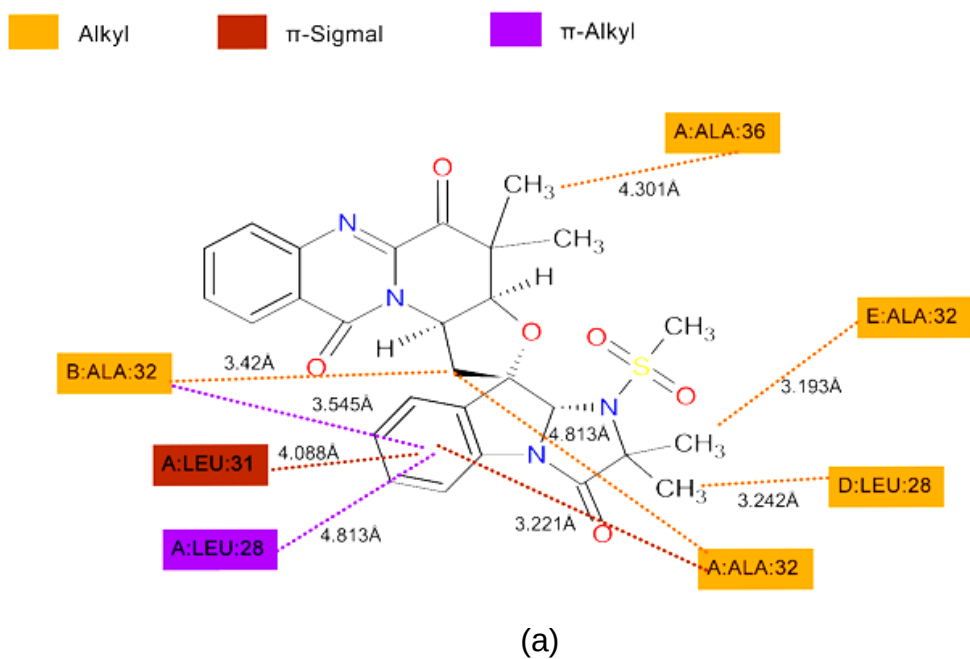
A interação com a M-pro foi a única que obteve ligação metálica. A interação molecular não covalente entre a face de um sistema π rico em elétrons, as energias de ligação são significativas, com os valores da fase de solução caindo na mesma ordem de magnitude das ligações. Semelhante a essas outras ligações não covalentes, as interações cátion- π desempenham um papel importante na natureza, particularmente na estrutura das proteínas, reconhecimento molecular e catálise enzimática.

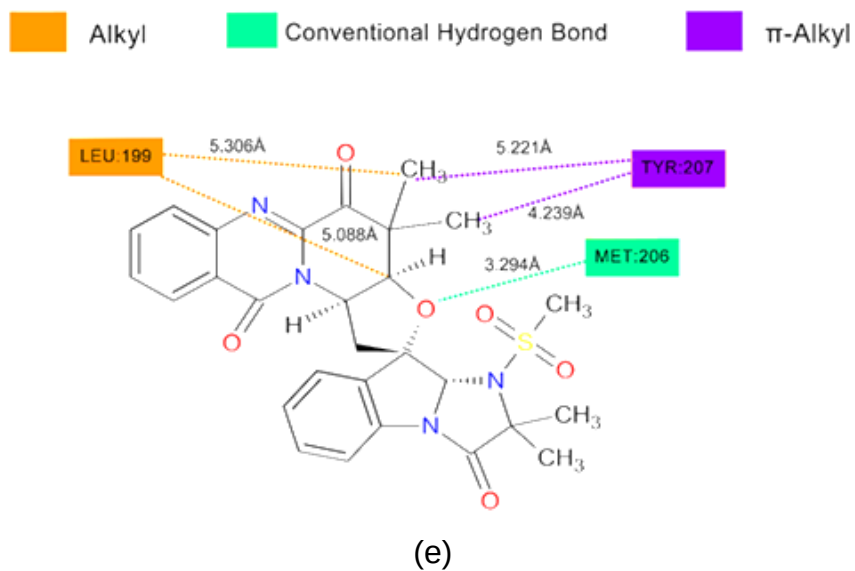
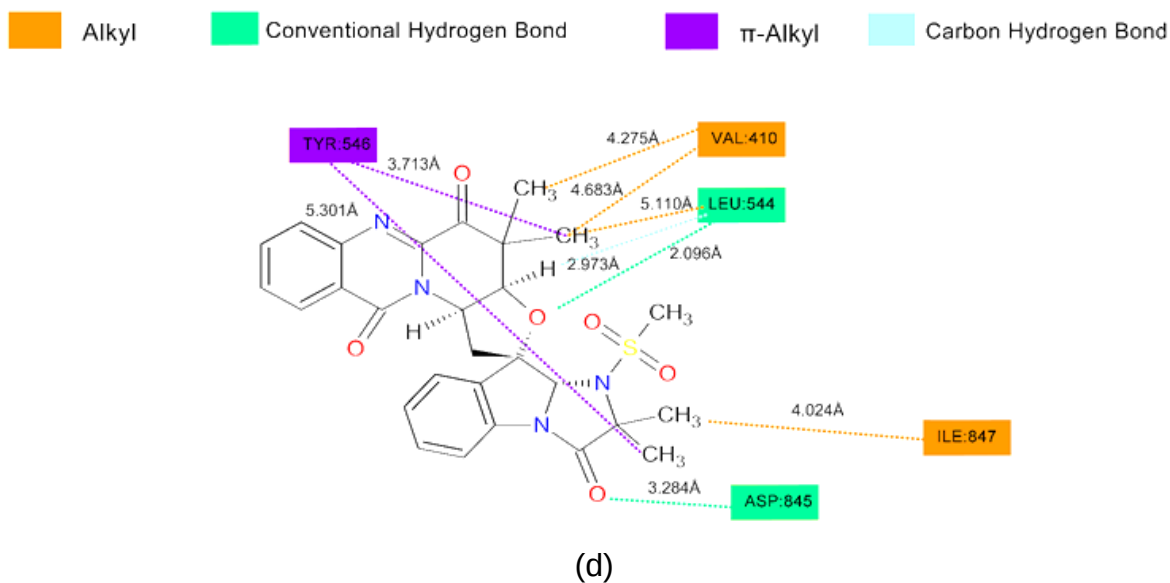
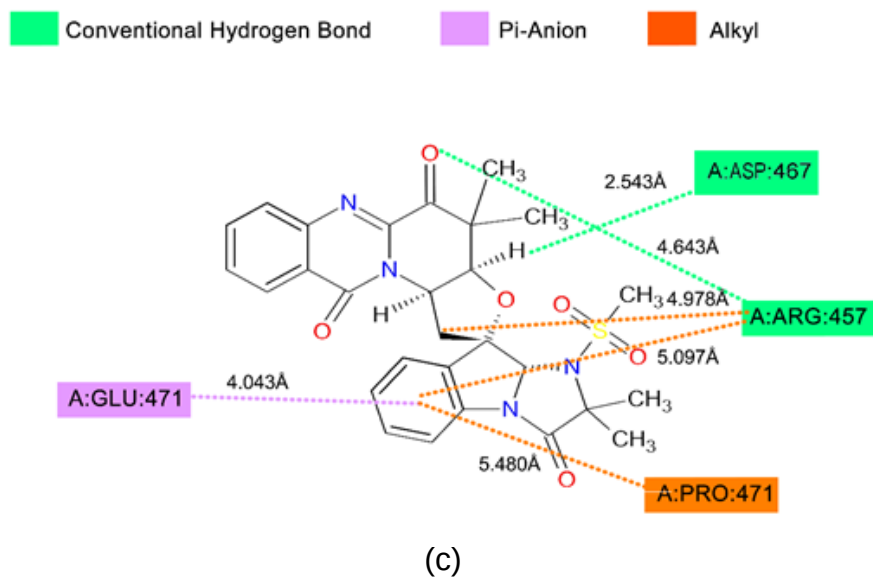
As interações com o Scedapina demonstram evidências de uma interação atrativa líquida entre uma região eletrofílica. A COVID-19 tornou-se uma preocupação global, devido aos surtos generalizados e à incerteza no tratamento. O Scedapina indicou interação adequada com a M-pro os resultados indicam a estabilidade adequada junto, para ambas os receptores. No entanto, simeprevir indica superioridade quando interage com a PL-pro em muitos termos, como interação com

ambos os resíduos catalíticos Leu 544 e Asp 845, que pode confirmar suas propriedades farmacocinéticas, identificado como um potencial inibidor por diferentes softwares para diferentes proteínas do vírus, atividade antiviral de amplo espectro, baixa energia de ligação livre, receptor comum, maior número de ligações de hidrogênio e estabilidade durante o tempo e, finalmente, sua supressão a replicação do vírus in vitro, o que o torna uma opção razoável para reaproveitar o tratamento de COVID-19.

A Figura 6b demonstra as interações do SceC com a M-pro, tais interações ocorreram no sítio catalítico da protease onde estão localizados os aminoácidos MET49, LEU27, CYS145, MET149, TYR54 e MET165. Para o restante das interações, sempre que realizamos DOC proteína - ligante, o que basicamente verificamos é a conformação do ligante com o qual ele está se ligando à proteína receptora e tentamos quantificar essa energia de ligação entre eles usando várias equações de campo de força. Agora, sempre que o ligante interage com a proteína, em nível atômico, são os elétrons que estão envolvidos na formação de ligações covalentes ou não covalentes. Essas interações π -anion, π -alkyl e metálica vêm na ampla categoria de interações não covalentes. Nas interações π - π -alkyl, há interação da nuvem de elétrons sobre um grupo aromático e um grupo de elétrons de qualquer grupo alquil. Na interação π -anion, a nuvem de elétrons π do anel aromático interage com o par solitário de nuvem de elétrons do átomo de enxofre.

Figura 6. Interações Scedapina- Macroestruturas: a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro.





Observa-se que o modo de interação da SceC predito pelas posições pode indicar que possui alta capacidade de interação. A SceC apresentou a maior quantidade de ligações de hidrogênio, as principais interações de ligação molecular e a energia de afinidade calculada foram utilizadas para avaliar a confiabilidade do complexo previsto, o DOC foi capaz de identificar uma conformação promissora. Outro aspecto importante a ser observado é que o sítio catalítico das estruturas externas foi respeitado, mantendo o padrão de interação nele. Uma descrição detalhada das ligações π e de hidrogênio está de acordo com a análise de acoplamento, verificou-se que existe afinidade da ligação, o que pode indicar um grau de influência deste tipo de interação para a energia de afinidade.

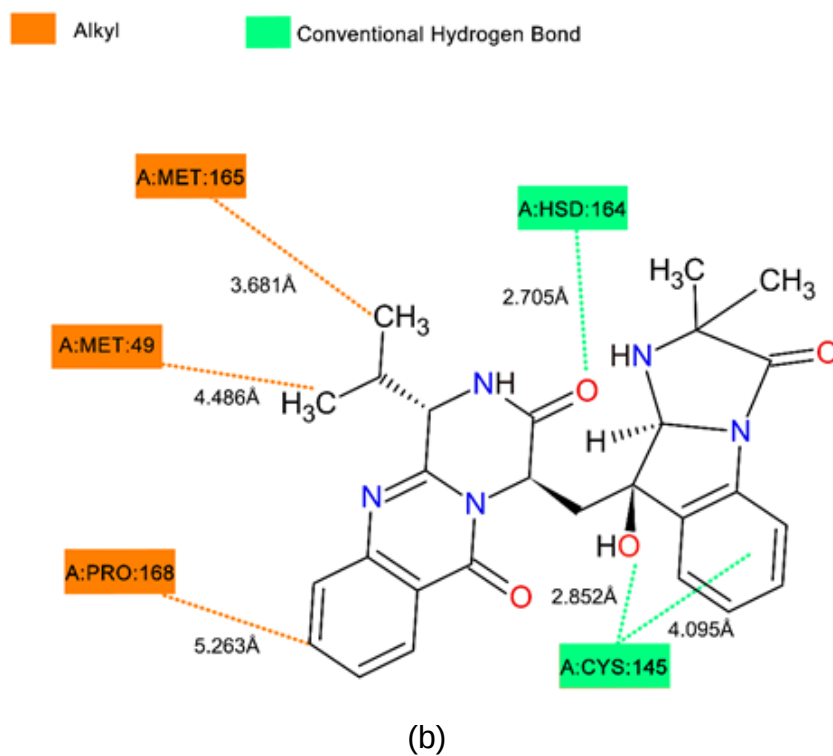
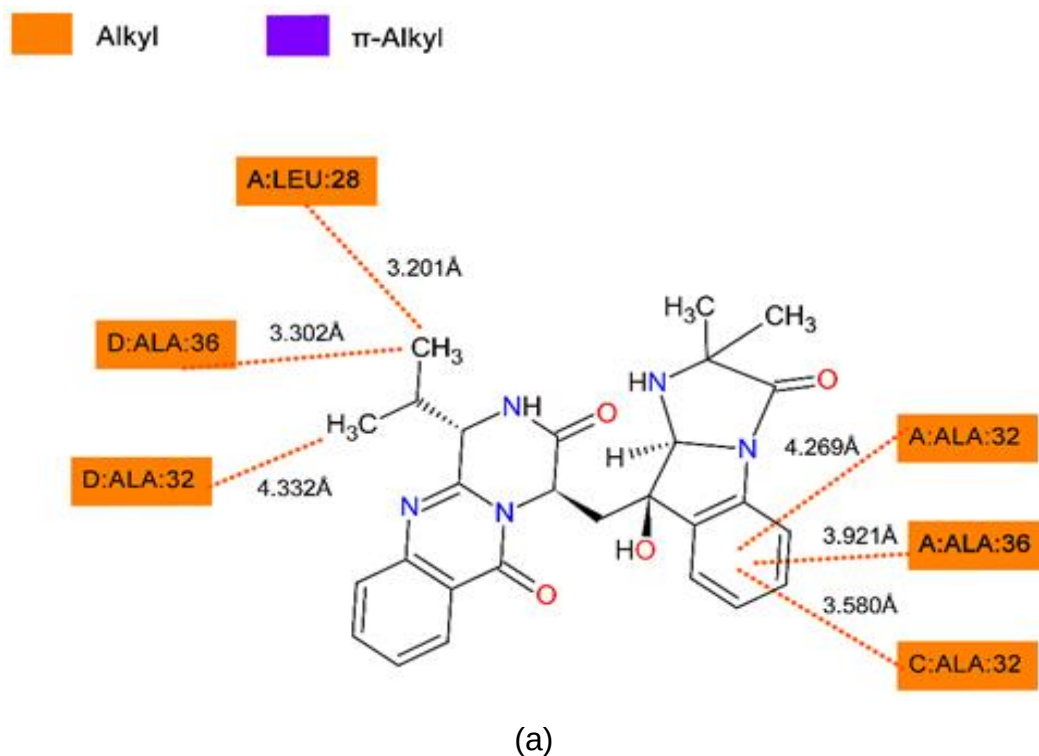
A formação de ligações de hidrogênio em quase todas as interações, exceto a com a E-pro, foi observada em todos os ligantes, enquanto as forças de Van der Waals são formadas com grupos alifáticos. Como as ligações são muito próximas e possuem características atrativas e hidrofóbicas, elas, portanto, podem relacionar que tais interações com estruturas macromoleculares contribuíram para a formação de melhores associações, explorando as diferenças de eletronegatividade entre os átomos.

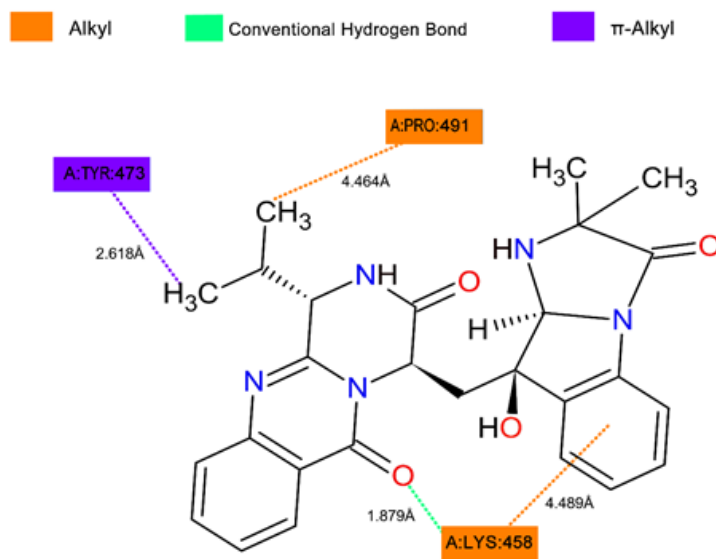
As posições assumidas pelos ligantes no sítio ativo permitem interações com os aminoácidos presentes. Cada posição tomada pode levar a associações com diferentes aminoácidos locais. Quanto menores forem as energias de ligação, mais fortes serão as interações que ocorrem entre as moléculas do ligante e os aminoácidos. Os estudos de DOC molecular para identificar e compreender a interação e afinidade de ligação. Em conformidade aos resultados anteriores, as interações da E-pro apresentaram em sua maioria ligações do tipo alkyl (Figura 7a).

As interações com b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro envolveram a formação de ligações de hidrogênio e π -Alkyl todas com o aminoácido GLU:166 na interação com a M-pro. Em todas as macroestruturas foram observadas interações do tipo π -alkyl, demonstrando a possibilidade de reação. Neste estudo percebemos que em todas as demais combinações entre receptor-cequinadolina analisadas, conservaram interações hidrofóbicas do tipo π -Alkyl. Isso demonstra possibilidade de interação e tendências nas para um projeto terapêutico. Além do estudo sobre a influência dos grupos retiradores de elétrons, outros aspectos também foram analisados. Assim, a inibição da interação entre a proteína spike SARS-CoV2 e o receptor da célula oferece a possibilidade de diminuir a taxa de infecção viral.

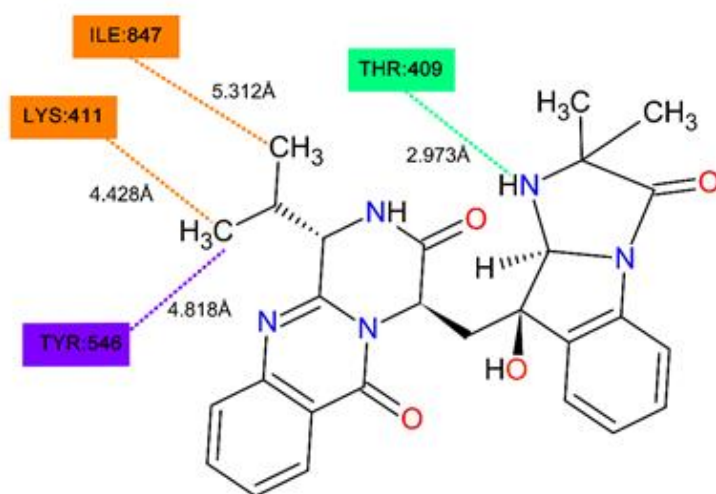
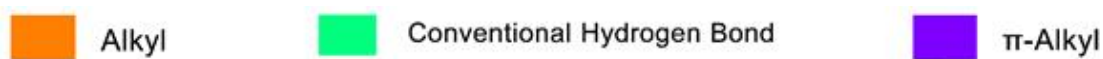
A Cequinadolina apresentou a maior afinidade de ligação contra o domínio de ligação de todas as macroestruturas. Nosso estudo revelou que ela exibiu afinidades de ligação mais altas para E-pro, M-Pro, S-gly, R-poly e PLpro, isso mostra que é um composto com potencial para serem desenvolvidos como agentes antivirais de amplo espectro - fornecendo proteção adicional contra doenças virais emergentes e reemergentes, como SARS-CoV2.

Figura 7. Interações Cequinadolina- Macroestruturas: a) E-pro, b) M-pro, c) S-gly, d) R-poly e e) PL-pro.

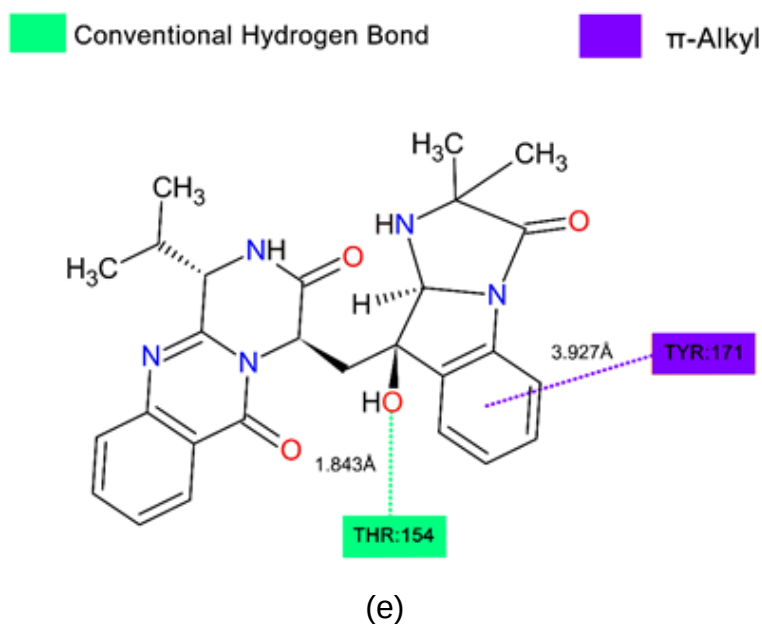




(c)



(d)



Devido ao papel crucial da S-gly no processo de infecção do SARS-CoV-2, este componente estrutural pode representar um alvo para neutralização mediada por anticorpos ou pequenas moléculas, sendo que a caracterização da estrutura de pré-fusão S permitiu a obtenção de informações essenciais do nível atômico para orientar o projeto e desenvolvimento agentes inibidores. Os aminoácidos essenciais do sítio ativo S-gly foram comparados com o relatado antes do estudo de DOC para validar a seleção da bolsa de ligação correta.

Neste estudo percebemos que em todas as demais combinações entre receptor-Cequinadolina analisadas, conservaram interações hidrofóbicas do tipo π -Alkyl. Isso demonstra possibilidade de interação e tendências para um projeto terapêutico. Além do estudo sobre a influência dos grupos retiradores de elétrons, outros aspectos também foram analisados. Assim, a inibição da interação entre a S-gly SARS-CoV2 e o receptor da célula oferece a possibilidade de diminuir a taxa de infecção viral.

A cequinadolina apresentou a maior afinidade de ligação contra o domínio de ligação de todas as macroestruturas. Nosso estudo revelou que ela exibiu afinidades de ligação mais altas para E-pro, M-Pro, S-gly, R-poly e PLpro, isso mostra que é um composto com potencial para serem desenvolvidos como agentes antivirais de amplo espectro - fornecendo proteção adicional contra doenças virais emergentes e reemergentes, como SARS-CoV2.

4.2. ANÁLISE DO MEP

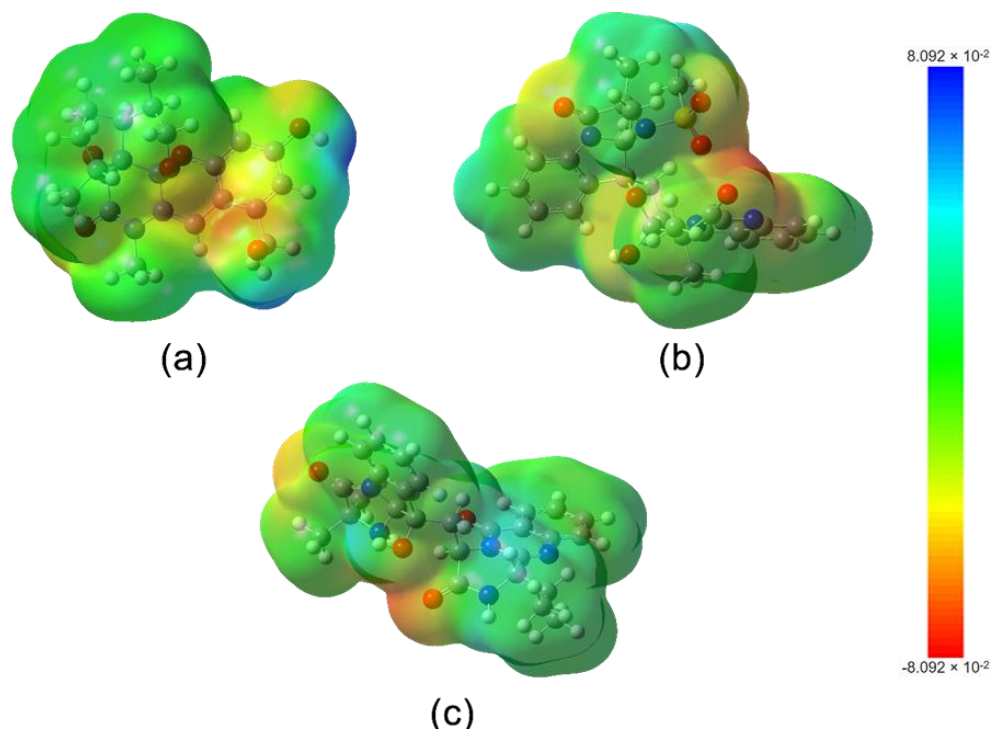
A atividade biológica de um ligante está relacionada com sua afinidade ao receptor-alvo. Determinados modos de conformação no encaixe do sítio ativo da enzima ocorrem para maximizar os contatos com resíduos específicos da enzima, o que aumenta as contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas, e de energia de afinidade de ligação na formação do complexo. De acordo com a análise de interação, é possível observar que o grupo aromático presente em todas as estruturas dos ligantes, sempre realizaram interações com resíduos enzimáticos, sugerindo que eles são importantes para a atividade desses fármacos.

A análise conformacional mostrou que o espaço conformacional acessado por esses compostos foi muito diferente. A melhor pose do estudo de DOC molecular foi selecionada para gerar os MEPs, além de diversos locais capazes de acomodar os inibidores estruturalmente e eletrostaticamente, usando um conjunto crítico de interações com cada ligante. O MEP foi aplicado para interpretar e prever o comportamento reativo das reações eletrofílicas e nucleofílicas. O MEP desempenha um papel fundamental na etapa inicial da conformação bioativa explicando as interações entre os receptor-ligante.

Os diferentes valores do potencial eletrostático na superfície são representados por cores diferentes; vermelho representa regiões de potencial eletrostático mais negativo, azul representa regiões de potencial eletrostático mais positivo e verde representa regiões de potencial moderado. Os potenciais eletrostáticos aumentam na ordem vermelho, laranja, amarelo, verde e azul. Assim, os potenciais eletrostáticos dos inibidores desempenham um papel significativo na interação e, conseqüentemente, influenciam o efeito de inibição. O MEP plotado para os ligantes mostrou a região potencial mais eletronegativa (cor vermelha) sobre o átomo de oxigênio nas possíveis interações químicas presentes. O MEP para moléculas polares como os fármacos revelam locais de poços que são mais ricos em elétrons e mais pobres em elétrons. A análise conformacional mostrou que o espaço conformacional acessado por esses compostos era muito diferente.

O MEP desempenha um papel fundamental na fase inicial da conformação bioativa, explicando as interações receptor-ligante. As cores vermelha, verde e azul indicam o alto acúmulo de carga negativa, região neutra e região positivamente carregada, respectivamente, como pode ser visto na Figura 8.

Figura 8. O potencial eletrostático molecular para o composto do título em: a) Rho, b) Sce, e c) Seq, nível teórico B3LYP / 6-31G (d,p).



A região de carga negativa e os grupos circundantes desempenham um papel fundamental na interação com as macroestruturas. Assim, os potenciais eletrostáticos dos inibidores desempenham um papel significativo na interação e, conseqüentemente, influenciam o efeito de inibição. O MEP plotado para os fármacos demonstram a região potencial mais eletronegativa (cor vermelha) no átomo de oxigênio nas interações químicas presentes, é possível observar que o contorno molecular do SceC e SeqA é mais eletronegativo e, portanto, muito contribui para o deslocamento eletrônico em suas estruturas moleculares.

O MEP é um descritor muito útil na compreensão de locais para ataque eletrofílico e reações nucleofílicas e para o estudo do processo de reconhecimento biológico. A Figura 8 fornece uma apresentação visual dos locais quimicamente ativos e de reatividade comparativa dos átomos. O potencial tem sido bastante útil como um indicador dos locais ou regiões do receptor que são inicialmente atraídas pela aproximação do eletrófilo / nucleófilo, e também foi aplicado com sucesso para determinar a melhor orientação relativa de cada ligante.

O potencial eletrostático negativo corresponde a uma atração do próton pela densidade agregada de elétrons no receptor (tons de vermelho), enquanto o potencial

eletrostático positivo corresponde à repulsão do próton pelos núcleos atômicos (tons de azul). As regiões negativas (vermelha e amarela) do MEP foram relacionadas à reatividade eletrofílica e as regiões positivas (azuis) à reatividade nucleofílica. O valor do potencial eletrostático é amplamente responsável pela ligação de um substrato aos seus locais de ligação ao receptor, uma vez que o receptor e o ligante correspondente se reconhecem em sua superfície molecular.

A maior concentração de cargas torna o receptor com maior tendência de reatividade para possíveis ligações químicas podem gerar inibição ou eletrocutando a proteína do vírus. A atração eletrostática é considerada característica comum de todos os sistemas iônicos, usando ambas as estratégias de simulação. Moléculas grandes geralmente estão associadas a uma maior polarizabilidade. A energia potencial eletrostática é influenciada pela polaridade das moléculas interagidas que podem ser expressas por um momento de dipolo. Quanto maior for a diferença nos valores de eletronegatividade dos átomos ligados, maior será o momento de dipolo.

4.3. DM

4.3.1. RMSD

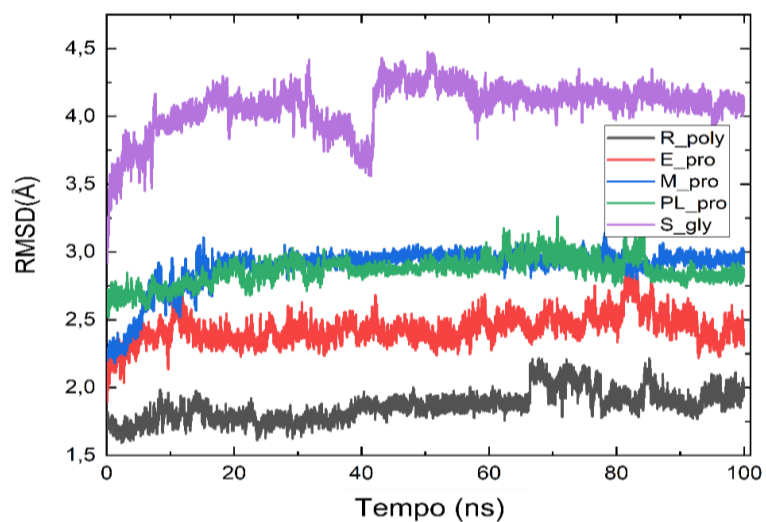
O RMSD mede a distância média entre átomos de estruturas sobrepostas, sendo assim comumente usado para comparação de similaridade. Além disso, os valores de RMSD também podem fornecer informações sobre o equilíbrio do sistema, ou seja, o momento em que a estrutura converge para sua conformação média mais estável. No início da simulação, os valores tendem a aumentar acentuadamente enquanto as estruturas tentam se equilibrar até atingirem um platô que sugere que as estruturas atingiram o equilíbrio. Como os valores de RMSD são dados em função do tempo, essa análise permite observar o período que as estruturas levam para se estabilizar. Para validar e confirmar a estabilidade dos complexos proteína-ligante sugeridos, realizamos simulação DM a 100 ns para os três fármacos com cada estrutura proteica do SARS-CoV-2 identificada em nossos estudos.

O RMSD para cada complexo foi calculado (Figura 9). O valor de RMSD pode prever a estabilidade do complexo ligante de execuções de MD. Um valor de RMSD mais baixo indica maior estabilidade do complexo. No geral, o RMSD médio para todos os complexos variou de 1.0 a 4.5Å. Assim, os resultados das análises de RMSD da trajetória para estruturas em complexo foram comparados, na Figura 9a podemos

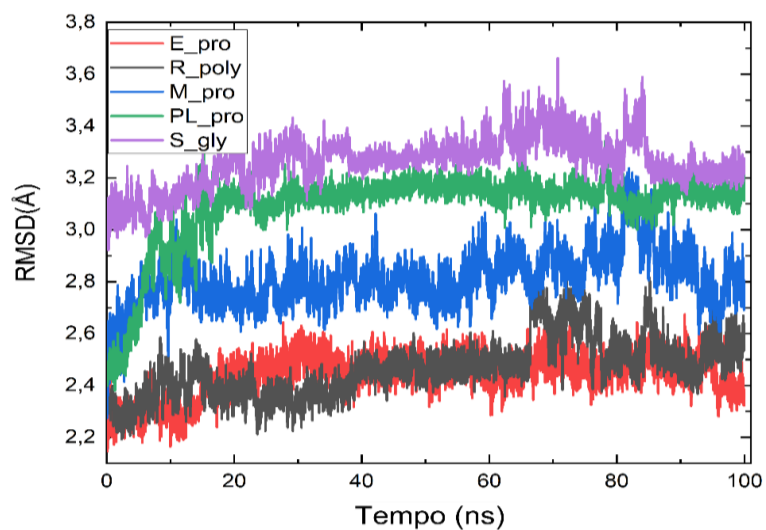
observar nas simulações com o Rodatina, que ele obteve maior estabilidade com a R-poly e menor com a S-gly as simulações com o Rho obtiveram estabilidade com pequenos saltos entre 40 e 50ns podemos observar um comportamento de estabilidade das estruturas. Foi observado nas simulações com o SceC que houve menor valor de RMSD com a E-pro e R-pol demonstrando possível estabilidade durante a trajetória, porém diferente dos resultados anteriores foi observada uma maior variação posicional do fármaco principalmente de 75ns a 85ns porém a simulação demonstrou maior estabilidade e menor distancia média em relação a anterior.

A simulação com a SeqA obteve valores médios de RMSD dentro do menor intervalo, as simulações obtiveram estabilidade e maior variação posicional no início, a interação da SeqA com a M-pro foi a mais estável, em contrapartida a R-poly obteve valores de RMSD maiores. Em geral, a SeqA permaneceu mais estável na presença das macroestruturas (Figura 9c) quando comparada aos outros resultados, porém a variação posicional pode se explicar por conta da natureza das proteínas e átomos que a conformam fazendo assim que a simulação não alcance um determinado padrão, porém o RMSD de todos os cinco complexos atingiu o equilíbrio ligeiramente aumentado em torno de 70 a 100ns e então gradualmente se estabilizou no final do início da simulação de MD.

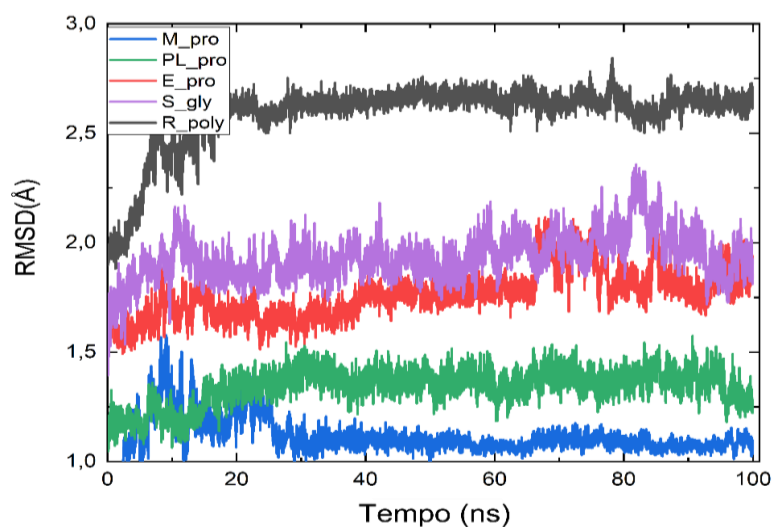
Figura 9. RMSD versus tempo dos receptores com: a) Rho, b) SceC e c) Seq.



(a)



(b)



(c)

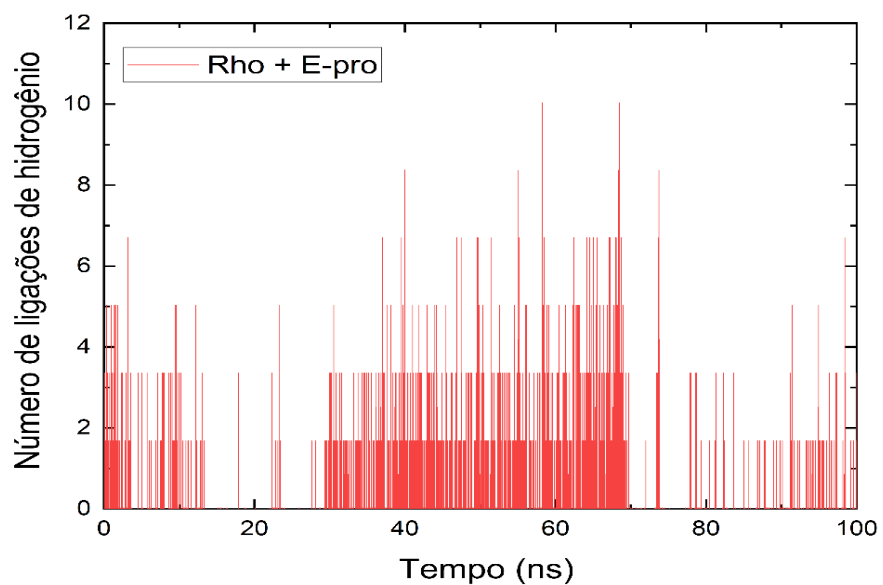
A estabilidade do RMSD inicial nos complexos era esperada devido à interação do inibidor com a proteína, o que diminuiu a flexibilidade geral da proteína. Isso é possível devido ao melhor perfil de interação do composto com o sítio catalítico. No entanto, uma análise mais detalhada da flexibilidade do esqueleto proteico foi possível a partir da maior amplitude de movimento que ocorreu devido à diminuição da flexibilidade na região de ligação da S-gly, que revelou a influência das interações. Consequentemente, durante a simulação de DM essas moléculas mostraram ter conformações mais estáveis.

As interações mostram que as interações eletrostáticas de um grupo polar com sua vizinhança podem ser descritas por um modelo simples de um dipolo com momento constante sob a ação de um campo de força. Essa relação é usada para desenvolver uma abordagem geral para gerar um modelo de carga baseado em energia eletrostática para moléculas contendo ligações químicas polares.

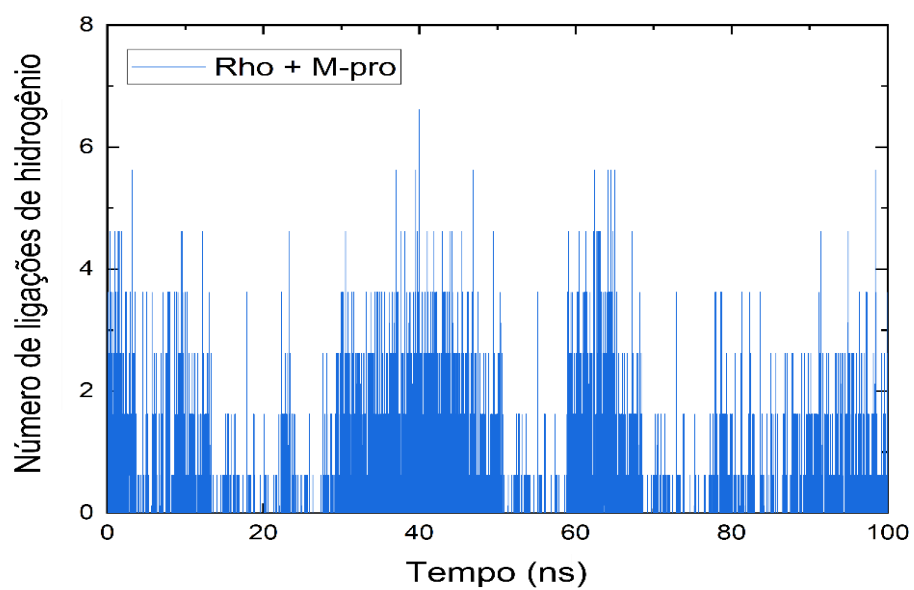
4.3.2. Ligações de Hidrogênio

As interações dependentes do tempo também foram avaliadas pela quantificação do número de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as macroestruturas e os ligantes. Na análise das médias HB's da interação (Figura. 10a) observou-se que o Rho fez mais conexões com a R-poly em relação às demais estruturas com o passar do tempo de simulação e obteve menor ligações de hidrogênio com a S-gly. A partir da análise da interação das HB's, observou-se que a quantidade de ligações de hidrogênio está interligada com os valores de RMSD, considerando que o Rho apresenta maior quantidade de ligações de hidrogênio em relação ao tempo de simulação e maior estabilidade de RMSD. A quantidade dessas ligações pode indicar que o fármaco está modificando a estrutura em alguns níveis mais do que em outros, o que pode ter consequências na função da estrutura.

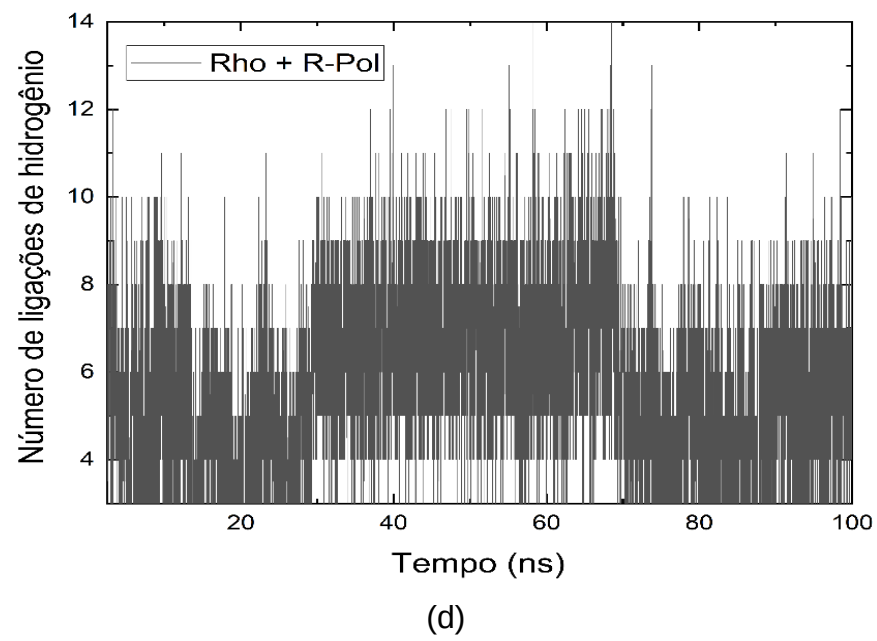
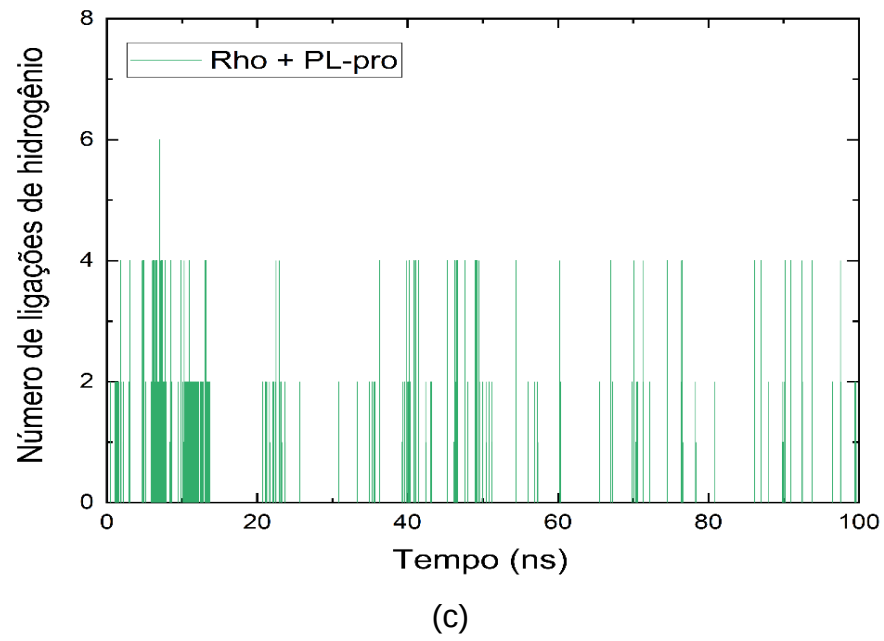
Figura 10. Ligações de hidrogênio versus tempo: a) Rho+E-pro, b) Rho+M-pro, c) Rho+PL-pro, d) Rho+R-pol e e) Rho+S-gly.

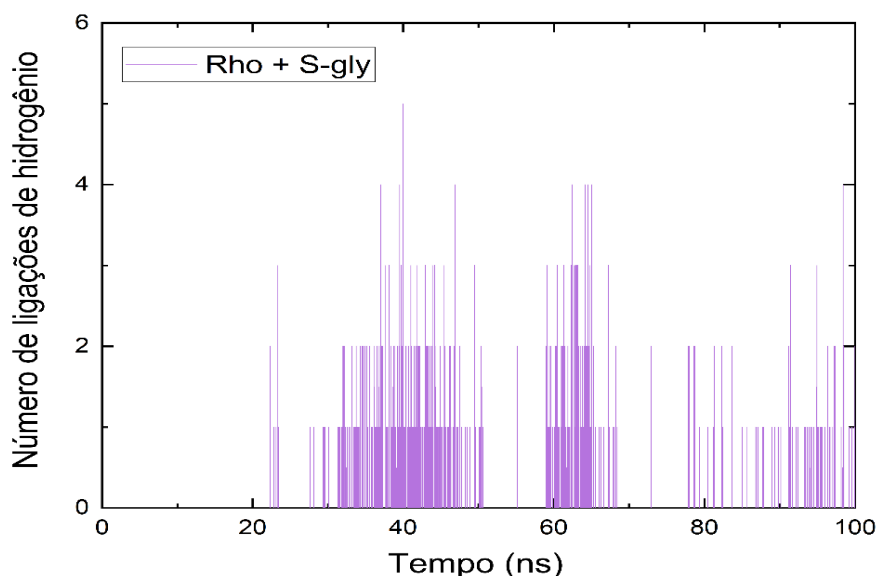


(a)



(b)

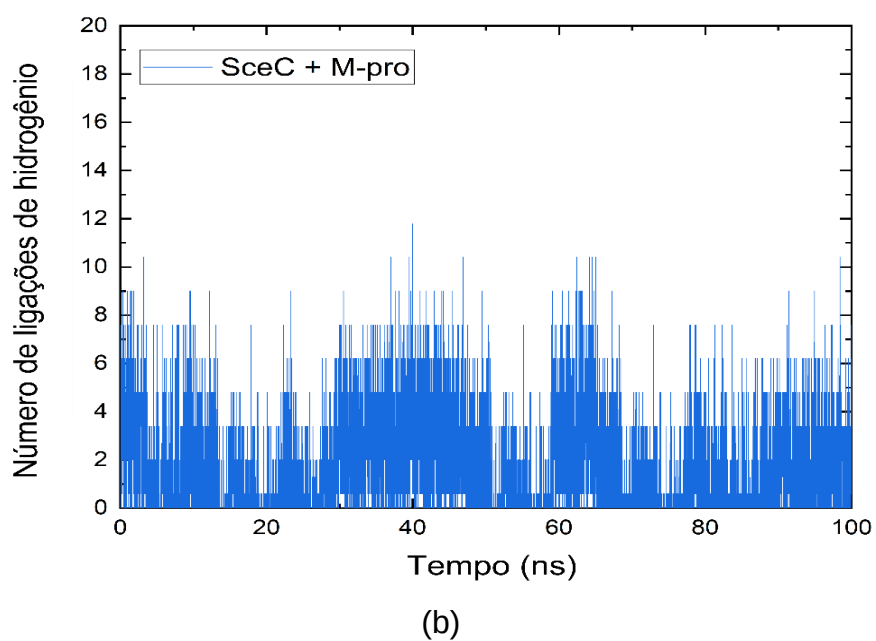
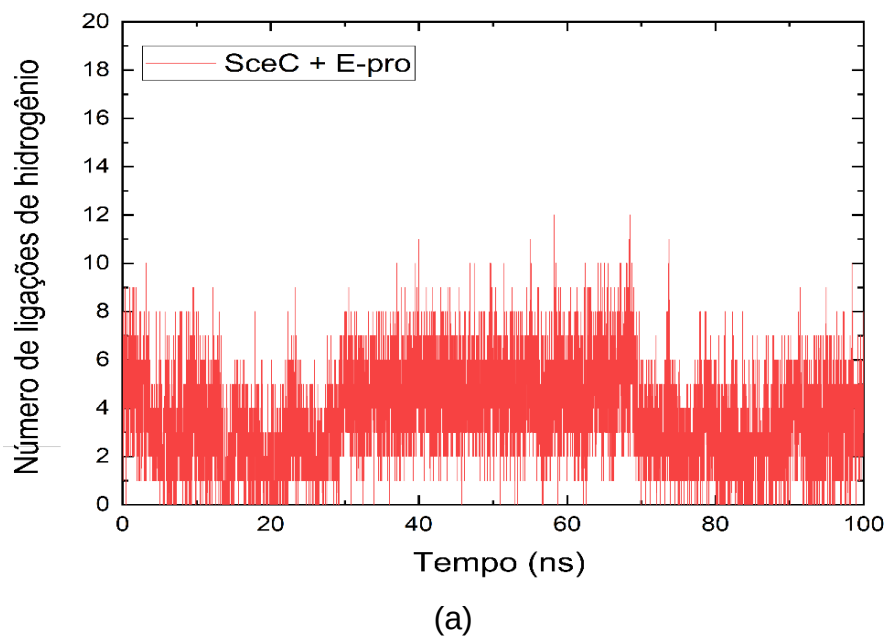


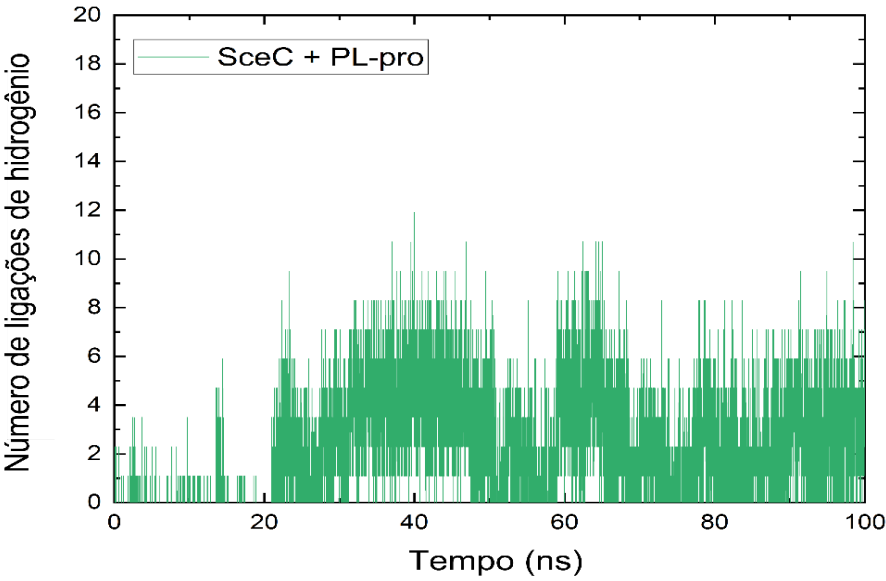


(e)

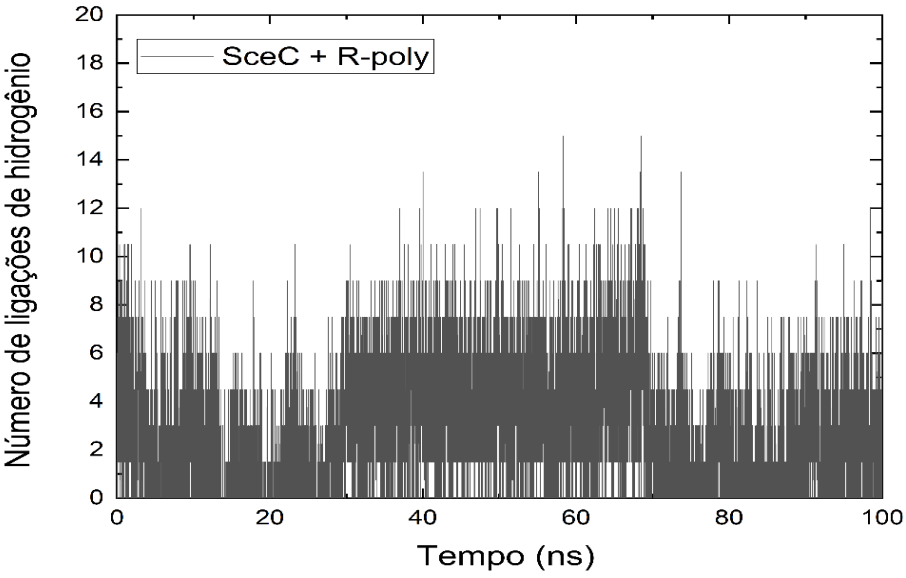
Uma ligação de hidrogênio é uma força intermolecular que forma um tipo especial de atração dipolo-dipolo quando um átomo de hidrogênio ligado a um átomo fortemente eletronegativo existe na vizinhança de outro átomo eletronegativo com um par solitário de elétrons. Na Figura 11 o SceC obteve ligações de hidrogênio com valores médio de 8 a 10, para quase todas as simulações. A interação com a S-gly também obteve valores baixos no início da simulação. As ligações de hidrogênio são geralmente mais fortes do que as forças dipolo-dipolo e de dispersão comuns, mas mais fracas do que as ligações covalentes e iônicas. A relação receptor-ligante concluiu informações farmacofóricas valiosas, que foram confirmadas pelos estudos de DOC e DM. A eletronegatividade do Sce devido a presença do enxofre em sua composição faz com que os elétrons livres carregados positivamente de forças repulsivas eletrostáticas mútuas exerçam de certa uma atração entre íons positivos e elétrons livremente móveis circundantes. As ligações de hidrogênio também desempenham um papel importante na definição da capacidade de deformação de proteínas.

Figura 11. Ligações de Hidrogênio versus tempo: a) SceC+E-pro; b) SceC+M-pro; c) SceC+PL-pro; d) SceC+R-poly; e) SceC+S-gly.

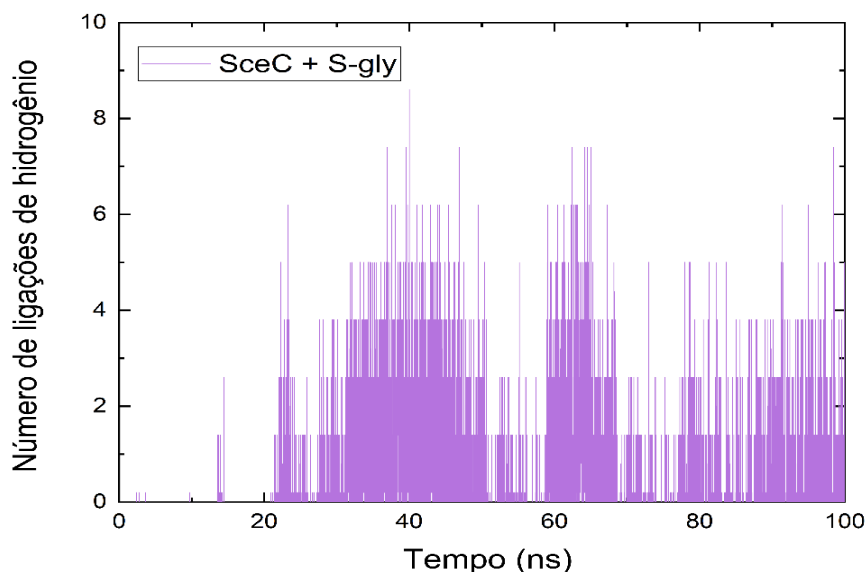




(c)



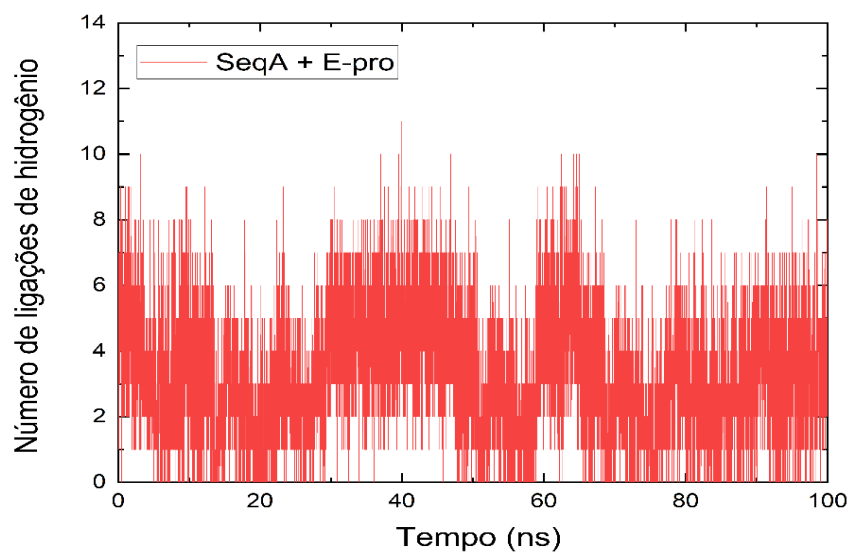
(d)



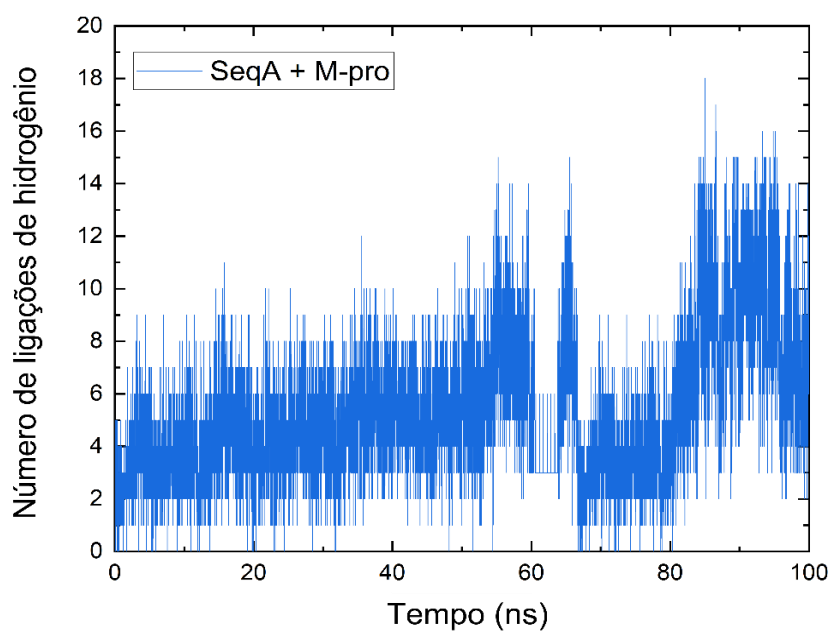
(e)

As forças intermoleculares atrativas que surgem devido à interação dipolo-dipolo entre um átomo de hidrogênio que está ligado a um átomo altamente eletronegativo e outro átomo altamente eletronegativo que se encontra na vizinhança. do átomo de hidrogênio, a natureza da SeqA, e sua cadeia aberta, propicia as ligações de hidrogênio, dado que dentre todas as simulações, com os outros fármacos o SceC foi o que obteve maior quantidade de ligações de hidrogênio por tempo de simulação, com destaque para a interações SeqA+M-pro e SeqA+E-pro (Figura 12a e 12b), onde obteve-se a média de 7 ligações no decorrer do tempo de simulação, o que confere com os resultados de RMSD, a localização do par de elétrons de ligação na ligação O-H é muito próxima ao núcleo de oxigênio (devido à grande diferença nas eletronegatividades de oxigênio e hidrogênio) e a quantidade de átomos de nitrogênio contribui para maior interação, e o átomo de oxigênio desenvolve uma carga parcial negativa ($-\delta$) e o átomo de hidrogênio desenvolve uma carga parcial positiva ($+\delta$). Agora, a ligação de hidrogênio pode ocorrer devido à atração eletrostática entre o átomo de hidrogênio de uma molécula de água (com carga $+\delta$) e o átomo de oxigênio de outra molécula de água (com carga $-\delta$). Assim, as ligações de hidrogênio são uma classe muito especial de forças atrativas intermoleculares que surgem apenas em compostos com átomos de hidrogênio ligados a um átomo altamente eletronegativo. As ligações de hidrogênio são principalmente fortes em comparação com as forças normais de dipolo-dipolo e de dispersão.

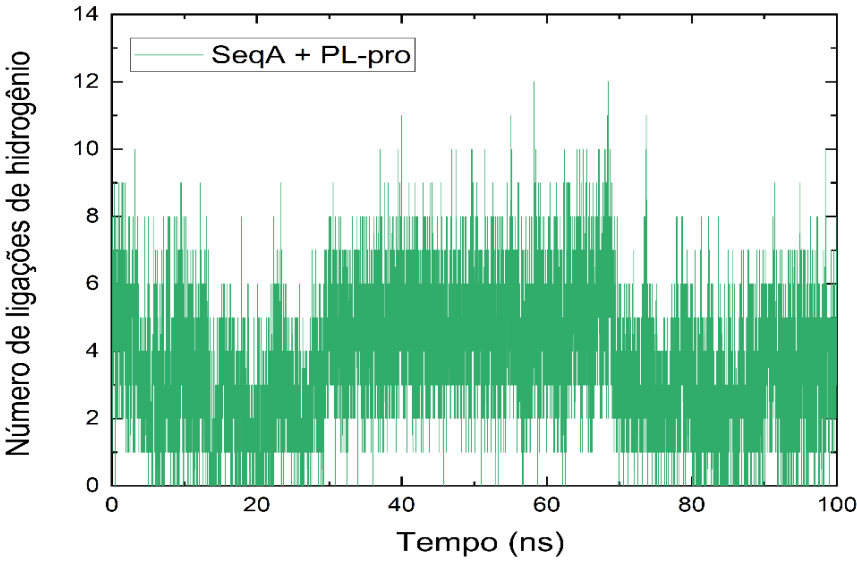
Figura 12. Ligações de hidrogênio versus tempo: a) SeqA+E-pro; b) SeqA+M-pro; c) SeqA+PL-pro; d) SeqA+R-poly; e) SeqA+S-gly.



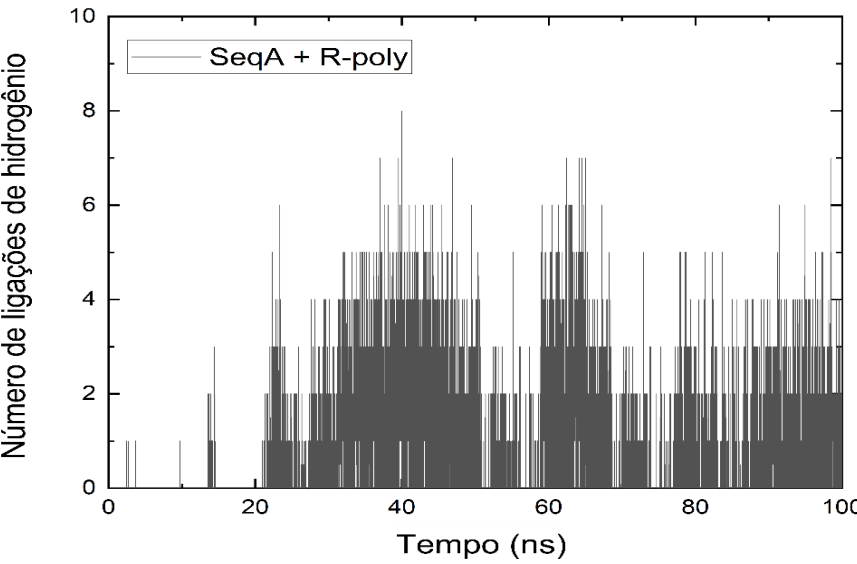
(a)



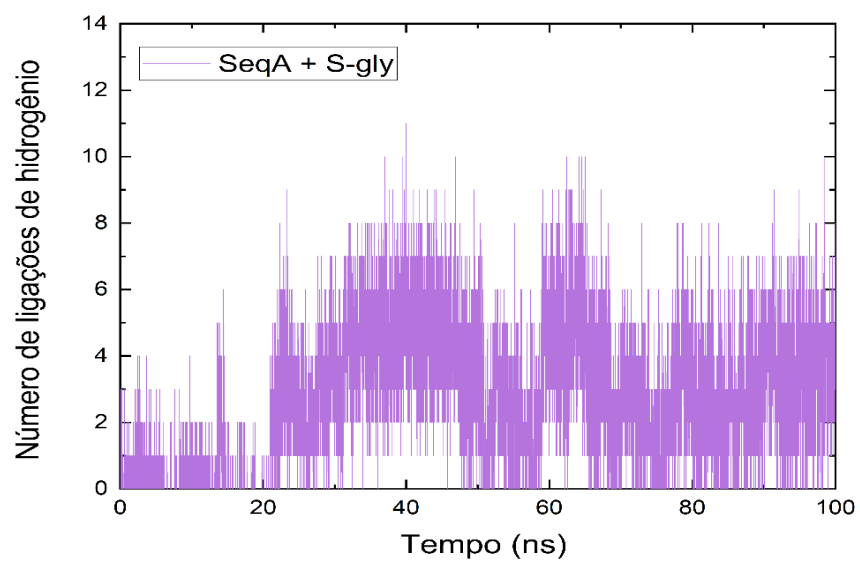
(b)



(c)



(d)



(e)

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES

Neste estudo foram selecionadas três fármacos (rodatina, scedapina C e cequinadolina A) já existentes para tratamento da infecção por hepatite C, que por meio de uma abordagem computacional, apresentam-se como potenciais inibidores para as principais estruturas da superfície do SARS-CoV-2. Após os testes de docagem, foi gerada uma postura divergente de ligantes, e foi considerada a melhor postura para processamento posterior e análise manual, a postura com a pontuação de DOC ideal e interações de ligação. Como as ligações são muito próximas e possuem características atrativas, elas, portanto, podem permitir relacionar que tais interações com as estruturas macromoleculares contribuíram para a formação de melhores conformações, analisando as diferenças de eletronegatividade entre os átomos. Cada posição assumidas pelos ligantes no sítio ativo permitem interações com os aminoácidos presentes. Quanto melhores forem as energias de ligação, mais fortes serão as interações que ocorrem entre as moléculas do ligante e os aminoácidos. O evento de ajuste está localizado em torno do domínio catalítico conhecido das estruturas cristalinas. Isso indica que a associação entre esses resultados de ancoragem e a eficácia do tratamento da COVID-19 tenha a possibilidade de ocorrer. Em conclusão, nossos resultados revelaram que os ligantes possuem interações fortes com as estruturas e podem ser potenciais agentes terapêuticos. A partir dos cálculos de DOC, observou-se que os três ligantes apresentaram tendência de se ancorar nos sítios ativos das macroestruturas, indicando que essa região possui maior afinidade química por essas moléculas. Além disso, o procedimento de DOC permitiu identificar quais aminoácidos são mais favoráveis para realizar ligações químicas com os ligantes.

Os resultados das análises de RMSD observados nas simulações de DM mostram que em geral, a SeqA permaneceu mais estável na presença das macroestruturas quando comparada aos outros resultados, porém o RMSD de todos os cinco complexos atingiu o equilíbrio ligeiramente aumentado em torno de 70 a 100ns e então gradualmente se estabilizou no final da simulação de MD.

A quantificação do número de ligações de hidrogênio estabelecidas entre as macroestruturas e os ligantes também foram avaliadas. Na análise das médias HB's

da interação observou-se que o Rho fez mais conexões com a R-poly em relação às demais estruturas com o passar do tempo de simulação e obteve menor ligações de hidrogênio com a S-gly. A partir da análise da interação das HB's, observou-se que a quantidade de ligações de hidrogênio está interligada com os valores de RMSD, considerando que o Rho apresenta maior quantidade de ligações de hidrogênio em relação ao tempo de simulação e maior estabilidade de RMSD. A quantidade dessas ligações pode indicar que o fármaco está modificando a estrutura em alguns níveis mais do que em outros, o que pode ter consequências na função da estrutura.

O trabalho aqui relatado aborda uma preocupação importante e a necessidade urgente de medicamentos para o tratamento da infecção por SARS-CoV-2. Esperamos que os resultados e previsões in sílico obtidos, possam facilitar a descoberta de potentes inibidores da protease principal da SARS-CoV-2. Os resultados das simulações mostram que os ligantes têm características de interação capaz de adsorver as proteínas, sendo, portanto, potenciais inibidores para as principais estruturas da superfície do SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. B., Page, J. B., Sankey, O. F., Sinha, K., Menendez, J., & Huffman, D. R. (1991). First-principles quantum molecular-dynamics study of the vibrations of icosahedral C 60. *Physical Review B*, 44(8), 4052.
- Anders, C., Urbassek, H. M., & Johnson, R. E. (2004). Linearity and additivity in cluster-induced sputtering: A molecular-dynamics study of van der Waals bonded systems. *Physical Review B*, 70(15), 155404.
- Araújo, J. L., Bastos, R. S., Santos, G. T., Alves, M. M. D. M., Figueiredo, K. A., Sousa, L. A. D., & Rocha, J. A. (2020). Molecular docking and evaluation of antileishmania activity of a ruthenium complex with epiisopiloturine and nitric oxide.
- Asha, K., & Kumar, B. (2019). Emerging influenza D virus threat: what we know so far!. *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 192.
- Ågren, R., Zeberg, H., Stepniewski, T. M., Free, R. B., Reilly, S. W., Luedtke, R. R., & Sahlholm, K. (2020). Ligand with Two Modes of Interaction with the Dopamine D2 Receptor—An Induced-Fit Mechanism of Insurmountable Antagonism. *ACS chemical neuroscience*, 11(19), 3130-3143.
- Arowosegbe, M. A., Amusan, O. T., Adeola, S. A., Adu, O. B., Akinola, I. A., Ogungbe, B. F., & Obasieke, P. E. (2020). Kaempferol as a Potential PAK4 Inhibitor in Triple Negative Breast Cancer: Extra Precision Glide Docking and Free Energy Calculation. *Current Drug Discovery Technologies*, 17(5), 682-695.
- Amaro, R. E., Baudry, J., Chodera, J., Demir, Ö., McCammon, J. A., Miao, Y., & Smith, J. C. (2018). Ensemble docking in drug discovery. *Biophysical journal*, 114(10), 2271-2278.
- Arif, R., Ahmad, S., Mustafa, G., Mahrosh, H. S., Ali, M., Tahir ul Qamar, M., & Dar, H. R. (2021). Molecular docking and simulation studies of antidiabetic agents devised from hypoglycemic polypeptide-p of momordica charantia. *BioMed research international*, 2021.
- Aleksandrov, A., Lin, F. Y., Roux, B., & MacKerell Jr, A. D. (2018). Combining the polarizable Drude force field with a continuum electrostatic Poisson–Boltzmann implicit solvation model. *Journal of computational chemistry*, 39(22), 1707-1719.
- Acharya, A., Agarwal, R., Baker, M. B., Baudry, J., Bhowmik, D., Boehm, S., & Zanetti-Polzi, L. (2020). Supercomputer-based ensemble docking drug discovery pipeline with application to COVID-19. *Journal of chemical information and modeling*, 60(12), 5832-5852.
- Asif, M., Saleem, M., Yaseen, H. S., Yehya, A. H., Saadullah, M., Zubair, H. M., & Mahrukh. (2021). Potential role of marine species-derived bioactive agents in the management of SARS-CoV-2 infection. *Future microbiology*, 16(16), 1289-1301.

- Amini, M., & Fincham, D. (1990). Evaluation of temperature in molecular dynamics simulation. *Computer physics communications*, 56(3), 313-324.
- Amini, M., Eastwood, J. W., & Hockney, R. W. (1987). Time integration in particle models. *Computer physics communications*, 44(1-2), 83-93.
- Akram, S., & Ann, Q. U. (2015). Newton raphson method. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 6(7), 1748-1752.
- Baidya, N., Ghosh, N. N., & Chattopadhyay, A. P. (2020). Inhibitory activity of hydroxychloroquine on COVID-19 main protease: an insight from MD-simulation studies. *Journal of Molecular Structure*, 1219, 128595.
- Burgoyne, N. J., & Jackson, R. M. (2006). Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein–protein and protein–ligand interfaces. *Bioinformatics*, 22(11), 1335-1342.
- Bitencourt-Ferreira, G., & de Azevedo Junior, W. F. (2021). Electrostatic potential energy in protein-drug complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 28(24), 4954-4971.
- BROOIJMANS, Natasja; KUNTZ, Irwin D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32, 335–373, 2003.
- Bickerton, E., Maier, H. J., Stevenson-Leggett, P., Armesto, M., & Britton, P. (2018). The S2 subunit of infectious bronchitis virus Beaudette is a determinant of cellular tropism. *Journal of Virology*, 92(19), e01044-18.
- Breidenbach, J., Lemke, C., Pillaiyar, T., Schäkel, L., Al Hamwi, G., Dieltz, M., & Müller, C. E. (2021). Targeting the main protease of SARS-CoV-2: from the establishment of high throughput screening to the design of tailored inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 60(18), 10423-10429.
- Bharatham, N., Bharatham, K., Shelat, A. A., & Bashford, D. (2014). Ligand binding mode prediction by docking: mdm2/mdmx inhibitors as a case study. *Journal of chemical information and modeling*, 54(2), 648-659.
- Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., & Kollman, P. A. (1993). A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(40), 10269-10280.
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *bmj*, 371.
- Cordes, A. K., Rehrauer, W. M., Accola, M. A., Wölk, B., Hilfrich, B., & Heim, A. (2021). Fully automated detection and differentiation of pandemic and endemic coronaviruses (NL63, 229E, HKU1, OC43 and SARS-CoV-2) on the hologic panther fusion. *Journal of Medical Virology*, 93(7), 4438-4445.

COVID, G. A., & Post-Acute Care Study Group. (2020). Post-COVID-19 global health strategies: the need for an interdisciplinary approach. *Aging clinical and experimental research*, 1.

COVID, C., Team, R., COVID, C., Team, R., COVID, C., Team, R., & Walters, M. (2020). Characteristics of health care personnel with COVID-19—United States, February 12–April 9, 2020. *Morbidity and mortality weekly report*, 69(15), 477.

Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., Hao, M., & Chen, W. (2020). A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*, 369(6504), 650-655.

Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., Kranz, D. M., & Procko, E. (2020). Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, 369(6508), 1261-1265.

Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., Hao, M., & Chen, W. (2020). A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2. *Science*, 369(6504), 650-655.

Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., Kranz, D. M., & Procko, E. (2020). Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, 369(6508), 1261-1265.

Das, S., Sarmah, S., Lyndem, S., & Singha Roy, A. (2021). An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3347-3357.

Dai, W., Zhang, B., Jiang, X. M., Su, H., Li, J., Zhao, Y., & Liu, H. (2020). Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science*, 368(6497), 1331-1335.

De Oliveira, O. V., Rocha, G. B., Paluch, A. S., & Costa, L. T. (2021). Repurposing approved drugs as inhibitors of SARS-CoV-2 S-protein from molecular modeling and virtual screening. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(11), 3924-3933.

Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. D. (2001). DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of computer-aided molecular design*, 15(5), 411-428.

Empereur-Mot, C., Pesce, L., Doni, G., Boichicchio, D., Capelli, R., Perego, C., & Pavan, G. M. (2020). Swarm-CG: automatic parametrization of bonded terms in MARTINI-based coarse-grained models of simple to complex molecules via fuzzy self-tuning particle swarm optimization. *ACS omega*, 5(50), 32823-32843.

Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(8), 3891-3898.

- Fathollahi-Fard, A. M., Ranjbar-Bourani, M., Cheikhrouhou, N., & Hajiaghaei-Keshteli, M. (2019). Novel modifications of social engineering optimizer to solve a truck scheduling problem in a cross-docking system. *Computers & Industrial Engineering*, 137, 106103.
- Faíco-Filho, K. S., Passarelli, V. C., & Bellei, N. (2020). Is higher viral load in SARS-CoV-2 associated with death?. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 103(5), 2019.
- Fakih, T. M. (2020). Dermaseptin-based antiviral peptides to prevent COVID-19 through in silico molecular docking studies against SARS-Cov-2 spike protein. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(4), 8.
- Fattebert, J. L., & Gygi, F. (2006). Linear-scaling first-principles molecular dynamics with plane-waves accuracy. *Physical Review B*, 73(11), 115124.
- Fernández-Pendás, M., Escribano, B., Radivojević, T., & Akhmatskaya, E. (2014). Constant pressure hybrid Monte Carlo simulations in GROMACS. *Journal of molecular modeling*, 20(12), 1-10.
- Freitas, B. T., Durie, I. A., Murray, J., Longo, J. E., Miller, H. C., Crich, D., & Pegan, S. D. (2020). Characterization and noncovalent inhibition of the deubiquitinase and deISGylase activity of SARS-CoV-2 papain-like protease. *ACS infectious diseases*, 6(8), 2099-2109.
- Frau, J., Flores-Holguín, N., & Glossman-Mitnik, D. (2018). Chemical reactivity properties, pKa values, AGEs inhibitor abilities and bioactivity scores of the mirabamides A–H peptides of marine origin studied by means of conceptual DFT. *Marine Drugs*, 16(9), 302.
- Forli, S., & Botta, M. (2007). Lennard-Jones potential and dummy atom settings to overcome the AUTODOCK limitation in treating flexible ring systems. *Journal of chemical information and modeling*, 47(4), 1481-1492.
- Fuhrmann, J., Rurainski, A., Lenhof, H. P., & Neumann, D. (2010). A new Lamarckian genetic algorithm for flexible ligand-receptor docking. *Journal of computational chemistry*, 31(9), 1911-1918.
- Fan, B. E. (2020). Hematologic parameters in patients with COVID-19 infection: a reply. *American journal of hematology*, 95(8), E215-E215.
- Frisch, A. (2009). Gaussian 09W Reference. Wallingford, USA, 25p.
- Grubmüller, H., Heller, H., Windemuth, A., & Schulten, K. (1991). Generalized Verlet algorithm for efficient molecular dynamics simulations with long-range interactions. *Molecular Simulation*, 6(1-3), 121-142.
- Guo, Y., Nishida, N., & Hoshino, T. (2021). Quantifying the Separation of Positive and Negative Areas in Electrostatic Potential for Predicting Feasibility of Ammonium Sulfate

for Protein Crystallization. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 61(9), 4571-4581.

Gao, X., Qin, B., Chen, P., Zhu, K., Hou, P., Wojdyla, J. A., & Cui, S. (2021). Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(1), 237-245.

Garg, S., Anand, A., Lamba, Y., & Roy, A. (2020). Molecular docking analysis of selected phytochemicals against SARS-CoV-2 Mpro receptor. *Vegetos*, 33(4), 766-781.

Gorzakiewicz, M., Appelhans, D., Boye, S., Lederer, A., Voit, B., & Klajnert-Maculewicz, B. (2019). Effect of the structure of therapeutic adenosine analogues on stability and surface electrostatic potential of their complexes with poly (propyleneimine) dendrimers. *Macromolecular Rapid Communications*, 40(15), 1900181.

García-Godoy, M. J., López-Camacho, E., García-Nieto, J., Del Ser, J., Nebro, A. J., & Aldana-Montes, J. F. (2019). Bio-inspired optimization for the molecular docking problem: state of the art, recent results and perspectives. *Applied Soft Computing*, 79, 30-45.

Gentile, D., Patamia, V., Fuochi, V., Furneri, P. M., & Rescifina, A. (2021). Natural Substances in the Fight of SARS-CoV-2: A Critical Evaluation Resulting from the Cross-Fertilization of Molecular Modeling Data with the Pharmacological Aspects. *Current Medicinal Chemistry*, 28(40), 8333-8383.

GUEDES, Isabela A.; MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. *Biophys. Rev.*, 2013.

Gurung, A. B., Ali, M. A., Lee, J., Farah, M. A., & Al-Anazi, K. M. (2021). An Updated Review of Computer-Aided Drug Design and Its Application to COVID-19. *BioMed Research International*, 2021.

Gupta, M. K., Vemula, S., Donde, R., Gouda, G., Behera, L., & Vadde, R. (2021). In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(7), 2617-2627.

Hattori, S. I., Higashi-Kuwata, N., Hayashi, H., Allu, S. R., Raghavaiah, J., Bulut, H., & Mitsuya, H. (2021). A small molecule compound with an indole moiety inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nature communications*, 12(1), 1-12.

Hassan, S. S., Choudhury, P. P., & Roy, B. (2020). SARS-CoV2 envelope protein: non-synonymous mutations and its consequences. *Genomics*, 112(6), 3890-3892.

He, Q., Chen, X., Yang, X., Li, G., Guo, H., Chu, H., & Wang, Y. (2021). Virtual Screening of Chinese Medicine Small Molecule Compounds Targeting SARS-CoV-2 3CL Protease (3CL pro). *Letters in Drug Design & Discovery*, 18(4), 355-364.

Hinsen, K. (2000). The molecular modeling toolkit: a new approach to molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 21(2), 79-85.

Hoehl, S., Rabenau, H., Berger, A., Kortenbusch, M., Cinatl, J., Bojkova, D., & Ciesek, S. (2020). Evidence of SARS-CoV-2 infection in returning travelers from Wuhan, China. *New England Journal of Medicine*, 382(13), 1278-1280.

Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129-1143.

Istyastono, E. P., Radifar, M., Yuniarti, N., Prasasty, V. D., & Mungkasi, S. (2020). PyPLIF HIPPOS: A molecular interaction fingerprinting tool for docking results of AutoDock Vina and PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(8), 3697-3702.

Islam, R., Parves, M. R., Paul, A. S., Uddin, N., Rahman, M. S., Mamun, A. A., & Halim, M. A. (2021). A molecular modeling approach to identify effective antiviral phytochemicals against the main protease of SARS-CoV-2. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3213-3224.

Ito, N. C., & Pongeluppe, L. S. (2020). O surto da COVID-19 e as respostas da administração municipal: munificência de recursos, vulnerabilidade social e eficácia de ações públicas. *Revista de Administração Pública*, 54, 782-838.

Jayaraj, J. M., Reteti, E., Kesavan, C., & Muthusamy, K. (2021). Structural insights on vitamin D receptor and screening of new potent agonist molecules: structure and ligand-based approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(11), 4148-4159.

Jiang, M., Wu, Z., Liu, L., & Chen, S. (2021). The chemistry and biology of fungal meroterpenoids (2009–2019). *Organic & Biomolecular Chemistry*, 19(8), 1644-1704.

Jia, W., Liu, J., Yu, Z., Zhang, X., Xu, X., Wang, Y., & Guo, F. (2021). Properties of Calmodulin Binding to NaV1. 2 IQ Motif and Its Autism-Associated Mutation R1902C. *Neurochemical Research*, 46(3), 523-534.

Joshi, T., Joshi, T., Sharma, P., Mathpal, S., Pundir, H., Bhatt, V., & Chandra, S. (2020). In silico screening of natural compounds against COVID-19 by targeting Mpro and ACE2 using molecular docking. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(8), 4529-4536.
Kannan, S. P. A. S., Ali, P. S. S., Sheeza, A., & Hemalatha, K. (2020). COVID-19 (Novel Coronavirus 2019)-recent trends. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(4), 2006-2011.

Keretsu, S., Bhujbal, S. P., & Cho, S. J. (2020). Rational approach toward COVID-19 main protease inhibitors via molecular docking, molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Scientific reports*, 10(1), 1-14.

KITCHEN, Douglas B.; et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, 935–949, 2004.

Kim, C. H. (2020). SARS-CoV-2 evolutionary adaptation toward host entry and recognition of receptor O-Acetyl sialylation in virus–host interaction. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4549.

Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G., & Langer, T. (2008). Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—what can we learn from earlier mistakes?. *Journal of computer-aided molecular design*, 22(3), 213-228.

Kroonblawd, M. P., Pietrucci, F., Saitta, A. M., & Goldman, N. (2018). Generating converged accurate free energy surfaces for chemical reactions with a force-matched semiempirical Model. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(4), 2207-2218.

Ke, X., Meng, L., Wan, X., Li, M., Sun, Y., Guo, Z., & Chen, Y. (2020). The rational and effective design of nonfullerene acceptors guided by a semi-empirical model for an organic solar cell with an efficiency over 15%. *Journal of Materials Chemistry A*, 8(19), 9726-9732.

Kumar, Y., Singh, H., & Patel, C. N. (2020). In silico prediction of potential inhibitors for the main protease of SARS-CoV-2 using molecular docking and dynamics simulation based drug-repurposing. *Journal of infection and public health*, 13(9), 1210-1223.

Koryanov, V. V., Kazakovtsev, V. P., Toporkov, A. G., & Nedogarok, A. A. (2019). Using the technology of inflatable structures for the removal of spacecraft's from low orbits. *International Journal of Mechanical Engineering and Robotics Research*, 8(3), 424-429.

Lange, J., de Souza, F. G., Nele, M., Tavares, F. W., Segtovich, I. S. V., da Silva, G. C. Q., & Pinto, J. C. (2016). Molecular Dynamic Simulation Of Oxaliplatin Diffusion In Poly (Lactic Acid-co-glycolic acid). Part A: parameterization and validation of the force-field CVFF. *Macromolecular Theory and Simulations*, 25(1), 45-62.

Lemkul, J. A., Roux, B., van der Spoel, D., & MacKerell Jr, A. D. (2015). Implementation of extended L agrangian dynamics in GROMACS for polarizable simulations using the classical D rude oscillator model.

Le Bris, C. (2005). Computational chemistry from the perspective of numerical analysis. *Acta Numerica*, 14, 363-444.

Li, S., Zhang, Y., Guan, Z., Li, H., Ye, M., Chen, X., & Peng, K. (2020). SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-10.

Liu, N., & Xu, Z. (2019). Using LeDock as a docking tool for computational drug design. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 218, No. 1, p. 012143). IOP Publishing.

Liu, Y., Grimm, M., Dai, W. T., Hou, M. C., Xiao, Z. X., & Cao, Y. (2020). CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(1), 138-144.

Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., & Lan, K. (2020). Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. *Nature*, 582(7813), 557-560.

Li, S., Zhang, Y., Guan, Z., Li, H., Ye, M., Chen, X., & Peng, K. (2020). SARS-CoV-2 triggers inflammatory responses and cell death through caspase-8 activation. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 1-10.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.

Lee, T. S., York, D. M., & Yang, W. (1995). A new definition of atomic charges based on a variational principle for the electrostatic potential energy. *The Journal of chemical physics*, 102(19), 7549-7556.

Liu, L., Miao, L., Li, L., Li, F., Lu, Y., Shang, Z., & Chen, J. (2018). Molecular electrostatic potential: a new tool to predict the lithiation process of organic battery materials. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(13), 3573-3579.

Liu, X., O'Harra, K. E., Bara, J. E., & Turner, C. H. (2021). Screening Ionic Liquids Based on Ionic Volume and Electrostatic Potential Analyses. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(14), 3653-3664.

Liu, X., Shi, D., Zhou, S., Liu, H., Liu, H., & Yao, X. (2018). Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 13(1), 23-37.

Li, G., Stenlid, J. H., Ahlquist, M. S., & Brinck, T. (2020). Utilizing the Surface Electrostatic Potential to Predict the Interactions of Pt and Ni Nanoparticles with Lewis Acids and Bases- σ -Lumps and σ -Holes Govern the Catalytic Activities. *The Journal of Physical Chemistry C*, 124(27), 14696-14705.

Li, J., Shen, X., Pan, Y., & Peng, Z. (2021). Fingerprinting the Ammonia Synthesis Pathway Using Spatiotemporal Electrostatic Potential Distribution of Intermediates. *ACS omega*, 6(9), 6292-6296.

Li, G. Y., & Chu, T. (2011). TD-DFT study on fluoride-sensing mechanism of 2-(2'-phenylureaphenyl) benzoxazole: the way to inhibit the ESIPT process. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(46), 20766-20771.

Mallon, D. H., Kling, C., Robb, M., Ellinghaus, E., Bradley, J. A., Taylor, C. J., & Kosmoliaptsis, V. (2018). Predicting humoral alloimmunity from differences in donor and recipient HLA surface electrostatic potential. *The Journal of Immunology*, 201(12), 3780-3792.

Meng, H., Maruyama, S., Xiang, R., & Yang, N. (2021). Thermal conductivity of one-dimensional carbon-boron nitride van der Waals heterostructure: A molecular dynamics study. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 180, 121773.

- Micaelo, N. M., Baptista, A. M., & Soares, C. M. (2006). Parametrization of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate/nitrate ionic liquid for the GROMOS force field. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(29), 14444-14451.
- Miron, R. A., & Fichthorn, K. A. (2005). Heteroepitaxial growth of Co/Cu (001): An accelerated molecular dynamics simulation study. *Physical Review B*, 72(3), 035415.
- Mills, M. J., & Popelier, P. L. (2014). Electrostatic forces: formulas for the first derivatives of a polarizable, anisotropic electrostatic potential energy function based on machine learning. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(9), 3840-3856.
- MOBLEY, David L.; DILL, Ken A. Binding of Small-Molecule Ligands to Proteins: 'What You See' Is Not Always 'What You Get'. *Structure*, 17, 489–498, 2009.
- Mohamud, Y., Xue, Y. C., Liu, H., Ng, C. S., Bahreyni, A., Jan, E., & Luo, H. (2021). The papain-like protease of coronaviruses cleaves ULK1 to disrupt host autophagy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 540, 75-82.
- Mortazavi, M., & Hosseinkhani, S. (2017). Surface charge modification increases firefly luciferase rigidity without alteration in bioluminescence spectra. *Enzyme and Microbial Technology*, 96, 47-59.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Huey, R., & Olson, A. J. (1996). Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4. *Journal of computer-aided molecular design*, 10(4), 293-304.
- Mukund V, Behera SK, Alam A, Nagaraju GP. Molecular docking analysis of nuclear factor- κ B and genistein interaction in the context of breast cancer. *Bioinformation*. 2019 Jan 31;15(1):11-17.
- Martins, L. S. C., de Souza, F. A. L., Ceolin, G. A., Jorge, F. E., de Berrêdo, R. C., & Campos, C. T. (2013). Augmented Gaussian basis sets for the elements K, Sc–Kr, Rb, and Y–Xe: Application in HF, MP2, and DFT calculations of molecular electric properties. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1013, 62-69.
- Mohammad, R. K., Madlol, R. A., Umran, N. M., & Sharrad, F. I. (2016). Structure and electronic properties of substitutionally doped cycloheptane molecule using DFT. *Results in physics*, 6, 1036-1043.
- Mizdal, C. R., Stefanello, S. T., Nogara, P. A., Soares, F. A. A., de Lourenço Marques, L., & de Campos, M. M. A. (2018). Molecular docking, and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides on *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 125, 393-400.
- Mossinghoff, G. J. (1999). Overview of the Hatch-Waxman Act and its impact on the drug development process. *Food & Drug LJ*, 54, 187.
- Montanari, C. A., & Bolzani, V. D. S. (2001). Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, 24, 105-111.

Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular modeling of proteins* (pp. 365-382). Humana Press.

Muegge, I., & Oloff, S. (2006). Advances in virtual screening. *Drug discovery today: technologies*, 3(4), 405-411.

Murray, D. M., & Hannan, P. J. (1990). Planning for the appropriate analysis in school-based drug-use prevention studies. *Journal of consulting and clinical psychology*, 58(4), 458.

Magrì, D., Navarro, A., Bergami, F., Percivalle, E., Ferrari, A., Lettieri, T., & Gioria, S. (2021). Impact of Viral Decontamination Method on Cytokine Profile of COVID-19 Patients. *Biomedicines*, 9(10), 1287.

Mahanta, S., Chowdhury, P., Gogoi, N., Goswami, N., Borah, D., Kumar, R., & Gogoi, B. (2021). Potential anti-viral activity of approved repurposed drug against main protease of SARS-CoV-2: an in silico based approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(10), 3802-3811.

Mahmud, S., Paul, G. K., Biswas, S., Afrose, S., Mita, M. A., Hasan, M., & Saleh, M. (2021). Prospective role of peptide-based antiviral therapy against the main protease of SARS-CoV-2. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 383.

Mandala, V. S., McKay, M. J., Shcherbakov, A. A., Dregni, A. J., Kolocouris, A., & Hong, M. (2020). Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nature structural & molecular biology*, 27(12), 1202-1208.

Maio, N., Lafont, B. A., Sil, D., Li, Y., Bollinger Jr, J. M., Krebs, C., & Rouault, T. A. (2021). Fe-S cofactors in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase are potential antiviral targets. *Science*, 373(6551), 236-241.

Maffucci, I., Hu, X., Fumagalli, V., & Contini, A. (2018). An efficient implementation of the Nwat-MMGBSA method to rescore docking results in medium-throughput virtual screenings. *Frontiers in chemistry*, 6, 43.

Nguyen, N. T., Nguyen, T. H., Pham, T. N. H., Huy, N. T., Bay, M. V., Pham, M. Q., & Ngo, S. T. (2019). Autodock vina adopts more accurate binding poses but autodock4 forms better binding affinity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(1), 204-211.

Nguyen, H. L., Thai, N. Q., Truong, D. T., & Li, M. S. (2020). Remdesivir strongly binds to both RNA-dependent RNA polymerase and main protease of SARS-CoV-2: evidence from molecular simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(50), 11337-11348.

Nakatsu, S., Murakami, S., Shindo, K., Horimoto, T., Sagara, H., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2018). Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes. *Journal of virology*, 92(6), e02084-17.

Naydenova, K., Muir, K. W., Wu, L. F., Zhang, Z., Coscia, F., Peet, M. J., & Russo, C. J. (2021). Structure of the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in the presence of favipiravir-RTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(7).

Narayanan, N., & Nair, D. T. (2020). Vitamin B12 may inhibit RNA-dependent-RNA polymerase activity of nsp12 from the SARS-CoV-2 virus. *IUBMB life*, 72(10), 2112-2120.

Nguyen, N. T., Nguyen, T. H., Pham, T. N. H., Huy, N. T., Bay, M. V., Pham, M. Q., & Ngo, S. T. (2019). Autodock vina adopts more accurate binding poses but autodock4 forms better binding affinity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(1), 204-211.

O'Shea, R., & Moser, H. E. (2008). Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *Journal of medicinal chemistry*, 51(10), 2871-2878.

Oliver, A., Hunter, C. A., Prohens, R., & Rosselló, J. L. (2018). An improved methodology to compute surface site interaction points using high density molecular electrostatic potential surfaces. *Journal of Computational Chemistry*, 39(28), 2371-2377.

Onawole, A. T., Popoola, S. A., Saleh, T. A., & Al-Saadi, A. A. (2018). Silver-loaded graphene as an effective SERS substrate for clotrimazole detection: DFT and spectroscopic studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 201, 354-361.

Osipiuk, J., Azizi, S. A., Dvorkin, S., Endres, M., Jedrzejczak, R., Jones, K. A., & Joachimiak, A. (2021). Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors. *Nature communications*, 12(1), 1-9.

Patra, M., & Karttunen, M. (2004). Systematic comparison of force fields for microscopic simulations of NaCl in aqueous solutions: diffusion, free energy of hydration, and structural properties. *Journal of computational chemistry*, 25(5), 678-689.

Pawar, S. S., & Rohane, S. H. (2021). Review on discovery studio: an important tool for molecular docking. *Asian J. Res. Chem*, 14, 86-88.

Páll, S., Zhmurov, A., Bauer, P., Abraham, M., Lundborg, M., Gray, A., & Lindahl, E. (2020). Heterogeneous parallelization and acceleration of molecular dynamics simulations in GROMACS. *The Journal of Chemical Physics*, 153(13), 134110.

Politzer, P., & Murray, J. S. (2002). The fundamental nature and role of the electrostatic potential in atoms and molecules. *Theoretical Chemistry Accounts*, 108(3), 134-142.

Politzer, P., Laurence, P. R., & Jayasuriya, K. (1985). Molecular electrostatic potentials: an effective tool for the elucidation of biochemical phenomena. *Environmental health perspectives*, 61, 191-202.

Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D520-D528, 2019.

Protein Data Bank: the single global archive for 3D macromolecular structure data. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D520-D528, 2019.

Park, S. E. (2020). Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clinical and experimental pediatrics*, 63(4), 119.

Paixão, G. P. D. N., Silva, R. S. D., Carneiro, F. N. N., & Lisboa, L. N. T. (2021). The pandemic of the new coronavirus (SARS-CoV-2) and its repercussions on stigmatization and prejudice. *Rev. baiana enferm*, e36986-e36986.

Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., & Ippodrino, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of translational medicine*, 18(1), 1-9.

Pan, P., Shen, M., Yu, Z., Ge, W., Chen, K., Tian, M., & Wu, J. (2021). SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. *Nature communications*, 12(1), 1-17.

Petushkova, A. I., & Zamyatnin, A. A. (2020). Papain-like proteases as coronaviral drug targets: Current inhibitors, opportunities, and limitations. *Pharmaceuticals*, 13(10), 277.

Pandit, B., Rondiya, S. R., Dzade, N. Y., Shaikh, S. F., Kumar, N., Goda, E. S., & Salunkhe, R. R. (2021). High stability and long cycle life of rechargeable sodium-ion battery using manganese oxide cathode: a combined density functional theory (DFT) and experimental study. *ACS applied materials & interfaces*, 13(9), 11433-11441.

Pereira, A., da Cruz, K. A. T., & Lima, P. S. (2021). Principais aspectos do novo coronavírus sars-cov-2: uma ampla revisão. *Arquivos do Mudi*, 25(1), 73-90.

Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D., Stone, J. E., Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., & Tajkhorshid, E. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. *The Journal of chemical physics*, 153(4), 044130.

Quimque, M. T. J., Notarte, K. I. R., Fernandez, R. A. T., Mendoza, M. A. O., Liman, R. A. D., Lim, J. A. K., & Macabeo, A. P. G. (2021). Virtual screening-driven drug discovery of SARS-CoV2 enzyme inhibitors targeting viral attachment, replication, post-translational modification and host immunity evasion infection mechanisms. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(12), 4316-4333.

Roe, D. R., & Cheatham III, T. E. (2018). Parallelization of CPPTRAJ enables large scale analysis of molecular dynamics trajectory data.

Romeo, I., Mesiti, F., Lupia, A., & Alcaro, S. (2021). Current updates on naturally occurring compounds recognizing SARS-CoV-2 druggable targets. *Molecules*, 26(3), 632.

Rodríguez-Guerra Pedregal, J., & Maréchal, J. D. (2018). PyChimera: use UCSF Chimera modules in any Python 2.7 project. *Bioinformatics*, 34(10), 1784-1785.

Rossi, G. A., Sacco, O., Mancino, E., Cristiani, L., & Midulla, F. (2020). Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. *Infection*, 48(5), 665-669.

Ramalingam, S., Karabacak, M., Periandy, S., Puviarasan, N., & Tanuja, D. (2012). Spectroscopic (infrared, Raman, UV and NMR) analysis, Gaussian hybrid computational investigation (MEP maps/HOMO and LUMO) on cyclohexanone oxime. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 96, 207-220.

Sandargo, B., Michehl, M., Stadler, M., & Surup, F. (2019). Antifungal sesquiterpenoids, rhodocoranes, from submerged cultures of the wrinkled peach mushroom, *rhodotus palmatus*. *Journal of Natural Products*, 83(3), 720-724.

Sargsyan, K., Grauffel, C., & Lim, C. (2017). How molecular size impacts RMSD applications in molecular dynamics simulations. *Journal of chemical theory and computation*, 13(4), 1518-1524.

Sinko, W., Lindert, S., & McCammon, J. A. (2013). Accounting for receptor flexibility and enhanced sampling methods in computer-aided drug design. *Chemical biology & drug design*, 81(1), 41-49.

Schreiner, W., Karch, R., Knapp, B., & Ilieva, N. (2012). Relaxation estimation of RMSD in molecular dynamics immunosimulations. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2012.

Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., & Sherman, W. (2010). Prediction of absolute solvation free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the OPLS force field. *Journal of chemical theory and computation*, 6(5), 1509-1519.

Shannon, A., Selisko, B., Le, N. T. T., Huchting, J., Touret, F., Piorkowski, G., & Canard, B. (2020). Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nature communications*, 11(1), 1-9.

Sevindik, M. (2021). Mushrooms as natural antiviral sources and supplements foods against coronavirus (COVID-19). *J Bacteriol. Mycol. Open Access*, 9, 73-76.

Ramakrishnan, R., Dral, P. O., Rupp, M., & Von Lilienfeld, O. A. (2014). Quantum chemistry structures and properties of 134 kilo molecules. *Scientific data*, 1(1), 1-7.

Rahman, M. S., Hoque, M. N., Islam, M. R., Islam, I., Mishu, I. D., Rahaman, M. M., & Hossain, M. A. (2021). Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene reports*, 22, 100997.

Rut, W., Lv, Z., Zmudzinski, M., Patchett, S., Nayak, D., Snipas, S. J., & Olsen, S. K. (2020). Activity profiling and crystal structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2 papain-like protease: A framework for anti-COVID-19 drug design. *Science advances*, 6(42), eabd4596.

Radisavljevic, S., Kesic, A. Đ., Cocic, D., Puchta, R., Senft, L., Milutinovic, M., & Petrovic, B. (2020). Studies of the stability, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, cytotoxic activity, DFT and molecular docking of some tetra- and penta-coordinated gold (iii) complexes. *New Journal of Chemistry*, 44(26), 11172-11187.

Rentzsch, R., & Renard, B. Y. (2015). Docking small peptides remains a great challenge: an assessment using AutoDock Vina. *Briefings in Bioinformatics*, 16(6), 1045-1056.

Shaker, S., Fan, R. Z., Li, H. J., & Lan, W. J. (2021). A pair of novel bisindole alkaloid enantiomers from marine fungus *Fusarium* sp. XBB-9. *Natural Product Research*, 35(9), 1497-1503.

Sethi, A., Joshi, K., Sasikala, K., & Alvala, M. (2019). Molecular docking in modern drug discovery: Principles and recent applications. *Drug discovery and development-new advances*, 2, 1-21.

Selwa, E., Elisée, E., Zavala, A., & Iorga, B. I. (2018). Blinded evaluation of farnesoid X receptor (FXR) ligands binding using molecular docking and free energy calculations. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 32(1), 273-286.

Sledz, P., & Caflisch, A. (2018). Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current opinion in structural biology*, 48, 93-102.

Schwaller, P., Laino, T., Gaudin, T., Bolgar, P., Hunter, C. A., Bekas, C., & Lee, A. A. (2019). Molecular transformer: a model for uncertainty-calibrated chemical reaction prediction. *ACS central science*, 5(9), 1572-1583.

Seyedin, S. H., & Shojaee, A. (2021). Overview of Coronavirus, Epidemiology Symptoms, Control, Virology, Vaccines, Treatment and New Findings to Save The People and Global Economy and Some Important Recommendations for The Future. *British Journal of Medical & Health Sciences (BJMHS)*, 3(6).

Saad, F. A. (2017). Elaborated molecular docking and DFT/B3LYP studies for novel sulfa drug complexes, spectral and antitumor investigations. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 129(1), 425-440.

Santos-Martins, D., Forli, S., Ramos, M. J., & Olson, A. J. (2014). AutoDock4Zn: an improved AutoDock force field for small-molecule docking to zinc metalloproteins. *Journal of chemical information and modeling*, 54(8), 2371-2379.

Santos, L. H., Ferreira, R. S., & Caffarena, E. R. (2019). Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. In *Docking screens for drug discovery* (pp. 13-34). Humana, New York, NY.

Salamah, N. N., Aryati, W. D., & Yanuar, A. (2019). Virtual screening of Indonesian herbal database as adenosine A2A antagonist using AutoDock and AutoDock vina. *Pharmacognosy Journal*, 11(6).

Scalmani, G., & Frisch, M. J. (2010). Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *The Journal of chemical physics*, 132(11), 114110.

Sk, M. F., Roy, R., Jonniya, N. A., Poddar, S., & Kar, P. (2021). Elucidating biophysical basis of binding of inhibitors to SARS-CoV-2 main protease by using molecular dynamics simulations and free energy calculations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(10), 3649-3661.

SPERANDIO, Olivier; et al. Receptor-based computational screening of compound databases: the main docking-scoring engines. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 7, 369–393, 2006.

Spitaleri, A., Decherchi, S., Cavalli, A., & Rocchia, W. (2018). Fast dynamic docking guided by adaptive electrostatic bias: The MD-binding approach. *Journal of chemical theory and computation*, 14(3), 1727-1736.

Shahinshavali, S., Hossain, K. A., Kumar, A. V. D. N., Reddy, A. G., Kolli, D., Nakhi, A., & Pal, M. (2020). Ultrasound assisted synthesis of 3-alkynyl substituted 2-chloroquinoxaline derivatives: Their in silico assessment as potential ligands for N-protein of SARS-CoV-2. *Tetrahedron letters*, 61(40), 152336.

Shoichet, B. K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature*, 432(7019), 862-865.

Svendsen, B., & Holst, J. J. (2021). Paracrine regulation of somatostatin secretion by insulin and glucagon in mouse pancreatic islets. *Diabetologia*, 64(1), 142-151.

Solerte, S. B., Di Sabatino, A., Galli, M., & Fiorina, P. (2020). Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) inhibition in COVID-19. *Acta diabetologica*, 57(7), 779-783.

Suresh, P., & Basu, P. K. (2008). Improving pharmaceutical product development and manufacturing: impact on cost of drug development and cost of goods sold of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 3(3), 175-187.

Toniatti, C., Jones, P., Graham, H., Pagliara, B., & Draetta, G. (2014). Oncology drug discovery: planning a turnaround. *Cancer discovery*, 4(4), 397-404.

Takahashi, J. A., Barbosa, B. V. R., Lima, M. T. N. S., Cardoso, P. G., Contigli, C., & Pimenta, L. P. S. (2021). Antiviral fungal metabolites and some insights into their contribution to the current COVID-19 pandemic. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 46, 116366.

Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., & Zheng, P. (2021). N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2. *Elife*, 10, e69091.

Tripathi, P. K., Upadhyay, S., Singh, M., Raghavendhar, S., Bhardwaj, M., Sharma, P., & Patel, A. K. (2020). Screening and evaluation of approved drugs as inhibitors of main protease of SARS-CoV-2. *International journal of biological macromolecules*, 164, 2622-2631.

Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of medicinal chemistry*, 49(11), 3315-3321.

TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 16, 151–166, 2002.

TALELE, T. T.; KHEDKAR, S. A.; RIGBY, A. C. Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic. *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 127–141, 2010.

Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., & Chen, X. (2020). Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 33-45.

Topping, J. (1927). On the mutual potential energy of a plane network of doublets. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character*, 114(766), 67-72.

Toto, A., Ma, S., Malagrinò, F., Visconti, L., Pagano, L., Stromgaard, K., & Gianni, S. (2020). Comparing the binding properties of peptides mimicking the Envelope protein of SARS-CoV and SARS-CoV-2 to the PDZ domain of the tight junction-associated PALS1 protein. *Protein Science*, 29(10), 2038-2042.

Vlasiou, M. C., & Pafti, K. S. (2021). Screening possible drug molecules for COVID-19. The example of vanadium (III/IV/V) complex molecules with computational chemistry and molecular docking. *Computational Toxicology*, 18, 100157.

Vuong, V. Q., Akkarapattiakal Kuriappan, J., Kubillus, M., Kranz, J. J., Mast, T., Niehaus, T. A., & Elstner, M. (2018). Parametrization and benchmark of long-range corrected DFTB2 for organic molecules. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(1), 115-125.

Warshel, A., & Papazyan, A. (1998). Electrostatic effects in macromolecules: fundamental concepts and practical modeling. *Current opinion in structural biology*, 8(2), 211-217.

Wang, Y., Anirudhan, V., Du, R., Cui, Q., & Rong, L. (2021). RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target. *Journal of medical virology*, 93(1), 300-310.

- Wang, J., Olsson, S., Wehmeyer, C., Pérez, A., Charron, N. E., De Fabritiis, G., & Clementi, C. (2019). Machine learning of coarse-grained molecular dynamics force fields. *ACS central science*, 5(5), 755-767.
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry*, 25(9), 1157-1174.
- Walker, B., Jing, Z., & Ren, P. (2021). Molecular dynamics free energy simulations of ATP: Mg²⁺ and ADP: Mg²⁺ using the polarisable force field AMOEBA. *Molecular simulation*, 47(5), 439-448.
- Williams, N. J., Seymour, I. D., Leah, R. T., Mukerjee, S., Selby, M., & Skinner, S. J. (2021). Theory of the electrostatic surface potential and intrinsic dipole moments at the mixed ionic electronic conductor (MIEC)–gas interface. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23(27), 14569-14579.
- Weng, G., Gao, J., Wang, Z., Wang, E., Hu, X., Yao, X., & Hou, T. (2020). Comprehensive evaluation of fourteen docking programs on protein–peptide complexes. *Journal of chemical theory and computation*, 16(6), 3959-3969.
- Xie, T., Li, Y., Jiang, Y., Pang, S., & Wu, H. (2021). Turning circle based trajectory planning method of an underactuated AUV for the mobile docking mission. *Ocean Engineering*, 236, 109546.
- XIE, Bing; MINH, David DL. Alchemical grid dock (algdock) calculations in the D3R grand challenge 3. *Journal of computer-aided molecular design*, v. 33, n. 1, p. 61-69, 2019.
- Xu, J., Chen, D., Li, W., & Xu, J. (2018). Surface potential extraction from electrostatic and Kelvin-probe force microscopy images. *Journal of Applied Physics*, 123(18), 184301.
- Yan, W., Lin, G., Zhang, R., Liang, Z., & Wu, W. (2020). Studies on the bioactivities and molecular mechanism of antioxidant peptides by 3D-QSAR, in vitro evaluation and molecular dynamic simulations. *Food & Function*, 11(4), 3043-3052.
- Yi, C., Sun, X., Ye, J., Ding, L., Liu, M., Yang, Z., & Sun, B. (2020). Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies. *Cellular & molecular immunology*, 17(6), 621-630.
- Yin, W., Luan, X., Li, Z., Zhou, Z., Wang, Q., Gao, M., & Eric Xu, H. (2021). Structural basis for inhibition of the SARS-CoV-2 RNA polymerase by suramin. *Nature structural & molecular biology*, 28(3), 319-325.
- Youssef, F. S., & Simal-Gandara, J. (2021). Comprehensive Overview on the Chemistry and Biological Activities of Selected Alkaloid Producing Marine-Derived Fungi as a Valuable Reservoir of Drug Entities. *Biomedicines* 2021, 9, 485.

Yuan, M. X., Qiu, Y., Ran, Y. Q., Feng, G. K., Deng, R., Zhu, X. F., & Li, H. J. (2019). Exploration of indole alkaloids from marine fungus *Pseudallescheria boydii* F44-1 using an amino acid-directed strategy. *Marine drugs*, 17(2), 77.

Yusuf, D., Davis, A. M., Kleywegt, G. J., & Schmitt, S. (2008). An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. *Journal of chemical information and modeling*, 48(7), 1411-1422.

Zheng, M., Karki, R., Williams, E. P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P., & Kanneganti, T. D. (2021). TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature immunology*, 22(7), 829-838.

Zalevsky, A. O., Zlobin, A. S., Gedzun, V. R., Reshetnikov, R. V., Lovat, M. L., Malyshev, A. V., & Golovin, A. V. (2019). Peptogrid—rescoring function for autodock vina to identify new bioactive molecules from short peptide libraries. *Molecules*, 24(2), 277.

Zhou, S., He, P., Dhindwal, S., Grum-Tokars, V. L., Li, Y., Parker, K., & Mrksich, M. (2021). Synthesis, Characterization, and Simulation of Four-Armed Megamolecules. *Biomacromolecules*, 22(6), 2363-2372.

Zhang, J. J., Dong, X., Cao, Y. Y., Yuan, Y. D., Yang, Y. B., Yan, Y. Q., & Gao, Y. D. (2020). Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*, 75(7), 1730-1741.

Zhan, G., Niu, S., Zhang, W., Zhou, X., Pang, J., Li, Y., & Zhan, J. (2022). A Docking Mechanism Based on a Stewart Platform and Its Tracking Control Based on Information Fusion Algorithm. *Sensors*, 22(3), 770.

Zhang, B. Z., Hu, Y. F., Chen, L. L., Yau, T., Tong, Y. G., Hu, J. C., & Huang, J. D. (2020). Mining of epitopes on spike protein of SARS-CoV-2 from COVID-19 patients. *Cell research*, 30(8), 702-704.

Zhao, M., Tang, Y., Xie, J., Zhao, Z., & Cui, H. (2021). Meroterpenoids produced by fungi: Occurrence, structural diversity, biological activities, and their molecular targets. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112860.