

Journal of Chemical Information and Modeling

Impact Factor 2021: 6.162

Citations 2021:30,162

CiteScore 2021: 7.7

<https://pubs.acs.org/page/jcisd8/submission/authors.html#TEMPLATES>

Windows

Microsoft Word 2010 for Windows | README file [PDF]

Dinâmica molecular do ácido nordihidroguaiarético potencial inibidor do vírus SARS-CoV-2

Erica de S. Conrado, Kathia M. Honório*

RESUMO

Ensaio *in silico* foram realizados com o objetivo de entender a interação de potenciais substâncias bioativas com a M^{Pro} de SARS-CoV-2. Para realização de estudos de triagem virtual, foi utilizado um conjunto de aproximadamente 200 moléculas disponíveis da empresa MERCK do Brasil, as quais foram submetidas às análises de acoplamento molecular (*docking*), visando analisar a potencialidade desses compostos como inibidores da *Main Protease*. Os resultados obtidos nos estudos de triagem virtual permitiram identificar três potenciais ligantes (inibidores) da enzima M^{Pro} que já apresentaram interações relevantes no sítio de interação e que podem estar relacionadas com a inibição da enzima. Destes três potenciais ligantes, foram realizados simulações de dinâmica molecular, cálculos de energia livre de ligação e avaliação das ligações de hidrogênio na molécula mais ativa, o ácido nordihidroguaiarético, que apresentou os melhores resultados das propriedades ADME-tox.

INTRODUÇÃO

SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) trata-se do terceiro coronavírus, desde o início do século XXI, que preocupa a humanidade. Os outros dois provocaram as enfermidades denominadas de SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) e MERS (*Middle East Syndrome*)¹. O SARS-CoV-2 é capaz de causar uma síndrome respiratória aguda grave chamada de COVID-19 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*)²

O vírus SARS-CoV-2 compõe-se de um envelope com aspecto de coroa e tem uma fita única de RNA³ (Figura 1). O genoma contém 14 quadros de leitura aberta (*open reading frame*) nos quais um terço codifica proteínas acessórias e estruturais (*spike*, envelope, membrana e o nucleocapsídeo). Dentre as não-estruturais temos a PLpro (*papain-like-protease*) e a Mpro (*main protease*)^{4,5,6}.

A protease principal, *Main Protease* (SARS-CoV-2^{MPro}), é uma enzima da classe das cisteíno-protease e um potencial alvo de candidatos a fármacos frente a COVID-19⁷. As proteases apresentam especificidades importantes, pois se ligam ao substrato de um modo particular devido a sua estrutura tridimensional e participam da quebra da ligação peptídica entre dois aminoácidos no processo de hidrólise⁸. Inibir a atividade dessa enzima teria a ação de bloquear o processo de replicação viral⁷.

Um importante fator para o potencial dessa protease como alvo é que não existe uma clivagem parecida com essa nos processos de replicação humana⁷⁻⁹. Desta forma, inibidores da *Main Protease* têm sido pesquisados em projetos de *drug discovery*, por não ter homólogo humano o que reduz as possibilidades de possíveis efeitos indesejados. Além disso, a alta similaridade entre

a sequência de aminoácidos do SARS-CoV e SARS-CoV-2 permite especular uma possível atividade inibitória de proteases parecidas¹⁰⁻¹².

MATERIAIS E MÉTODOS

Conjunto de dados

A busca de uma estrutura cristalográfica da enzima SARS-CoV-2^{MPro} foi realizada no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>). A estrutura cristalográfica com código PDB = 6Y2F foi escolhida para os estudos de acoplamento molecular e possui resolução igual a 1,95 Å sendo um complexo com a α -cetoamida como inibidor¹². Sua estrutura consiste em três domínios, conforme é possível ver na Figura 2.

O conjunto de dados utilizados neste estudo foram fornecidos pela empresa MERCK do Brasil com o intuito de buscar um potencial inibidor da M^{pro}¹³.

Acoplamento molecular (docking)

O acoplamento molecular (*docking*) é um procedimento computacional eficaz para o reconhecimento da interação receptor-ligante existente em um complexo¹⁴. O programa aplicado para as simulações de *docking* é conhecido como GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), que permite analisar as conformações produzidas dos ligantes realizando um ranqueamento (*scoring*). Deste modo, pode-se analisar as interações intermoleculares formadas no sítio de ligação¹⁴.

Os ligantes selecionados foram otimizados no programa Sybyl 8.1 utilizando-se o método semiempírico PM3 e suas cargas foram calculadas com o módulo MOPAC. O mesmo programa

foi utilizado para realizar a preparação da estrutura da enzima SARS-CoV-2 *main protease* (PDB ID: 6Y2F). Para isso, foi empregado o módulo Biopolymer que otimiza os átomos de hidrogênio e determina as cargas atômicas do receptor a partir do método MM94¹⁵.

As simulações de acoplamento molecular foram executadas com o melhor resultado obtido com o reacoplamento molecular no programa GOLD 5.2¹⁴. Após as análises de *redocking*, os melhores parâmetros foram encontrados (função ChemScore, resíduos Hys163 e Gln189 flexíveis e sítio ativo com um raio de 7Å) e utilizados nas demais simulações de *docking* com a base de compostos da empresa Merck do Brasil.

Propriedades Farmacocinéticas

Aspectos como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade precisaram ser investigadas para entender qual a concentração de uma determinada molécula precisa estar para atingir seu alvo biológico mantendo-se em sua forma bioativa em tempo satisfatório para que aconteça a interação entre a enzima de estudo e o ligante¹⁶⁻¹⁸. Para realizar as análises farmacocinéticas, o servidor usado para os cálculos das propriedades foi o SwissADME¹⁸.

Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular calculam as posições atômicas do complexo em um determinado período de tempo; em geral, as simulações do sistema proteína-alvo + inibidor é realizado em nanosegundo ($1\text{ns}=10^{-9}\text{ s}$)¹⁹. Os campos de força são funções de energia potencial empíricas que podem ser implementadas no sistema molecular de interesse²⁰. Um exemplo de parâmetros utilizados no campo de força pode ser visto na equação 1. O programa utilizado para executar os cálculos citados anteriormente foi o AMBER19²¹.

O cálculo da carga RESP (*Restrained Electrostatic Potential*)³⁷ foi realizado no programa Gaussian 09²². A análise da melhor caixa solvente para a proteína alvo foi realizada utilizando o programa Chimera 1.12²³. Para a preparação da topologia do ligante utilizou-se o módulo Antechamber, a inserção do campo de força ff99SB pelo módulo Tleap e a inserção das coordenadas periódicas com moléculas de água do tipo TIP3P foram todos realizados no programa AMBER19. A análise do valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) analisa a estabilidade das trajetórias e o valor de RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*) do esqueleto proteico (*backbone*) indica possíveis flutuações que ocorrem nas posições dos resíduos de aminoácido do SARS-CoV-2 ^{Mpro} ao interagir com o ligante. Vale destacar também que a análise das trajetórias de tempo foi realizada pelo programa VMD²⁴.

Cálculos MM-PBSA e MM-GBSA

A partir do resultado selecionado pelo valor de RMSD da simulação de DM, foi possível obter a trajetória mais estável para o complexo e com a utilização dessa trajetória foi possível estimar a energia livre por MM-PBSA e MM-GBSA.²⁵ Para os cálculos de MM-PBSA e MM-GBSA, foi gerado o arquivo de entrada (*input*) contendo as coordenadas necessárias para os cálculos de energia livre por MM-PBSA e MM-GBSA.²⁵. Nesse arquivo são especificados os *frames* iniciais e finais dos trechos mais estáveis da trajetória obtida pela DM, assim como os resíduos de aminoácidos, o inibidor, e mascarar as moléculas de água e os dois íons sódio que neutralizam o sistema; os métodos utilizados para o cálculo da energia de ligação foram MM-GBSA e MM-PBSA; a concentração de sal considerada para os cálculos MM-GBSA foi 0,100 M; a força iônica para os cálculos MM-PBSA foi igual a 0,100 μM; a tensão superficial do sistema foi

0,00542 kcal/mol. Por fim, o cálculo foi realizado e os valores de energia livre de ligação do sistema (SARS-CoV-2^{Mpro} + Molécula 1) foram estimados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a realização do estudo de acoplamento molecular foi necessário realizar o *redocking* com o intuito de verificar os melhores parâmetros a serem empregados no *docking* dos potenciais inibidores (banco de compostos da Merck do Brasil) da enzima SARS-CoV-2^{Mpro}. O inibidor cristalográfico foi construído e minimizado no programa Sybyl¹⁵ para que ele fosse inserido no sítio da enzima SARS-CoV-2^{Mpro} (PDB ID: 6Y2F, resolução de 1,95 Å). Em seguida, foram realizadas as simulações de *redocking*. A execução foi feita variando a cavidade do sítio de ligação (5Å, 7Å e 10Å), assim como as funções de *scoring* disponíveis no pacote GOLD²⁰ (ChemPLP, ASP, Goldscore e Chemscore).

O resultado mais significativo foi encontrado com a função de *scoring ChemScore*, considerando um sítio de 7Å em torno do ligante e flexibilidade dos resíduos His163 e Gln189. A partir de informações experimentais sobre a enzima SARS-CoV-2^{Mpro}, pode-se verificar que os resíduos His163 e Gln189 realizam importantes interações do tipo ligação de hidrogênio e interações estéricas com o ligante cristalográfico α -cetoamida⁷. A Figura 3 ilustra os resultados de *redocking* obtidos nesta etapa do trabalho.

Acoplamento molecular (*Docking*)

Após a execução do reacoplamento molecular, foi realizada a triagem virtual utilizando o método de acoplamento molecular das moléculas do conjunto de dados disponíveis pela empresa Merck, buscando possíveis inibidores do SARS-CoV-2^{Mpro}.

Os resultados de *docking* (Figura 4) indicaram três moléculas como promissoras a partir dos valores de ΔG obtidos via cálculo com a função de *scoring* ChemScore, inspeção visual e propriedades ADME-Tox¹⁸.

Os resultados indicados na Figura 4, mostra como a molécula 1 obteve o melhor valor de ΔG (-42,302 kcal/mol) apresentando interações com os resíduos Phe183 e Ala191. É possível observar também que há interações π entre o resíduo de aminoácido Phe183 e os anéis aromáticos da molécula acoplada.

Analisando os resultados de *docking* para a molécula 2, pode-se observar as principais interações desta substância no sítio ativo do alvo biológico de interesse. Essa substância possui o segundo melhor valor de ΔG (-36,865 kcal/mol) e apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Arg186, Thr188 e Ala189. Já a molécula 3 acoplada no sítio ativo da enzima SARS-CoV-2^{Mpro} apresenta um valor de ΔG igual a -32,061 kcal/mol. Contudo, das moléculas avaliadas, ela apresenta interações do tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Glu164 e Gln187. Os principais resultados obtidos nas análises de *docking* estão apresentados na Tabela 1.

A molécula 1, (4-[(2R,3S)-4-(3,4-Dihidroxifenil)-2-3-dimetilbutil]1-2benzenodiol), também conhecida como ácido nordihidroguaiarético, apresenta um valor significativo de ΔG , permitindo aferir uma relativa estabilidade no processo de *docking* desta molécula com o alvo a enzima M^{pro}. Assim, existe uma grande probabilidade desta molécula ter capacidade de uma ação inibitória frente à enzima protease. A outra molécula que também apresenta uma considerável energia livre de ligação, sugerindo uma possível atividade inibitória frente à enzima protease em estudo, é a molécula 2 (1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicerol). A molécula 1, mais bem ranqueada na triagem virtual, foi analisada em detalhes a fim de identificar mais informações sobre o sítio de

ligação. Assim, foram gerados mapas de contribuição eletrostática e superfícies hidrofóbica e hidrofílica (Figura 5) empregando o programa Chimera. A análise do potencial eletrostático, ou seja, a distribuição de cargas de um sistema e o caráter hidrofóbico e hidrofílico são importantes para mostrar as características do sítio de ligação com o intuito de compreender o comportamento do inibidor na cavidade de interação²³.

Propriedades Farmacocinéticas

As propriedades farmacocinéticas das moléculas selecionadas na etapa anterior foram calculadas utilizando o servidor SwissAdme que possibilitou calcular os valores de log *S*, solubilidade, absorção gastrointestinal (*GI absorption*), violações das regras de Lipinski (*druglikeness*) e lipofilicidade (log *P*)¹⁸. A Tabela 2 apresenta os valores das propriedades farmacocinéticas das três moléculas selecionadas na triagem virtual.

Dinâmica Molecular

A melhor candidata à conformação bioativa da molécula **1**, a partir do *docking*, foi submetida à simulação de dinâmica molecular. Essa técnica utiliza-se dos cálculos oriundos da mecânica clássica nos quais se considera as partículas unidas por forças harmônicas e elásticas²⁶. O gráfico 1 apresenta os valores de RMSD.

O gráfico de RMSD para a trajetória da enzima SARS-CoV-2^{MPro} e a molécula **1** (mais ativa) selecionada na triagem virtual pode ser relacionado à estabilidade da trajetória e a flexibilidade do complexo. Para uma maior afinidade do inibidor com o complexo pode-se utilizar como parâmetro a flexibilidade em alvos farmacêuticos, ou seja a sua mobilidade é importante ser mensurada²⁷. O complexo SARS-CoV-2^{MPro}, ilustrado no gráfico 1, mostra um bom encaixe e uma estabilidade significativa do complexo gerado.

O gráfico 2 exibe as ligações de hidrogênio que acontecem entre a molécula 1 (a partir das trajetórias de tempo) e os resíduos principais do sítio ativo de SARS-CoV-2^{MPro} (Ser142, Cys143, Glu164, His170, Arg186, Gln187, Thr188 e Gln190). Essa técnica foi realizada no programa VMD e as ligações de hidrogênio apresentadas no gráfico 2 estimam as ligações por aceptores e doadores de ligações de hidrogênio; os dados relacionados ao tempo apresentados na figuras estão em *frames* (100 *Frames* = 1 ns). Pode-se observar que o sistema analisado possui duas ligações de hidrogênio (Molécula 1 + Ser142 e Molécula + Glu164) estáveis em todo o período. Isso sugere uma maior estabilidade de SARS-CoV-2^{MPro} diante da molécula 1, pois a enzima SARS-CoV-2^{MPro} conserva as interações de hidrogênio apresentadas acima por um tempo maior durante a trajetória.

Também foi feita a análise dos valores de RMSF, cálculo que analisa a estabilidade das trajetórias (gráfico 3), mostrando as flutuações dos resíduos de aminoácidos. Os principais resíduos que mostram ter ligações (Ser142, Cys143, His163, Glu164, His170, Arg186, Gln187, Thr188, Gln189 e Gln190) devem flutuar em graus menores que a enzima na forma APO. O gráfico 3 mostra as flutuações para o sistema de SARS-CoV-2^{MPro} com a molécula 1 (melhor ranqueada) acoplada no seu sítio ativo.

O gráfico 3 demonstra as flutuações do *backbone* (átomos de carbono e nitrogênio da cadeia principal de aminoácidos da enzima SARS-CoV-2^{MPro}) e os resíduos principais do sítio ativo. Com base no gráfico de RMSF, verifica-se que as variações entre os resíduos principais de SARS-CoV-2^{MPro} e a molécula 1 estão abaixo de 3 Å, diferente da enzima na forma APO que possui valores abaixo de 8 Å. As variações dos resíduos de aminoácido principais no complexo (SARS-CoV-2^{MPro} + Molécula 1) apontados no gráfico são menores que as flutuações da enzima

na forma APO. Isso pode estar relacionado com a estabilidade do complexo e a potencial capacidade inibitória da molécula 1 na enzima SARS-CoV-2^{Mpro}.

Cálculos MM-GBSA e MM-PBSA

Após a escolha da sub trajetória mais estável pelas simulações de dinâmica molecular (gráficos de RMSD), foi possível realizar os cálculos de energia livre de ligação (ΔG) referente ao complexo (SARS-CoV2^{MPro} + Molécula 1) em estudo, a partir dos métodos MM-PBSA e MM-GBSA. Essas simulações foram realizadas com o objetivo de analisar a estabilidade do complexo. Desta forma, os valores das energias livres de ligação calculadas pelos dois métodos (MM-GBSA e MM-PBSA) e os valores obtidos a partir do *docking* podem ser consultados na Tabela 3.

A partir dos resultados de MM-GBSA e MM-PBSA mostrados na Tabela 3, é possível constatar a estabilidade do complexo a partir do baixo valor de energia livre, o que se manteve desde a análise dos resultados de *docking*, indicando o potencial inibitório da molécula selecionada na triagem virtual.

CONCLUSÃO

A partir do alvo selecionado (enzima SARS-CoV-2 Mpro), importante no processo de replicação do vírus SARS-CoV-2, foi possível realizar estudos in silico para entender as principais interações entre um conjunto de substâncias bioativas. Além disso, foi realizado um processo de triagem virtual considerando um conjunto de quase 200 moléculas disponíveis pela empresa Merck como potenciais inibidores de protease em estudo. Esse processo permitiu, a partir de simulações de acoplamento molecular, encontrar quatro

potenciais moléculas como substâncias inibidoras da enzima SARS-CoV-2 Mpro. Estudos de propriedades farmacocinéticas considerando critérios de absorção, distribuição, metabolismo e excreção e relacionados com a regra dos cinco de Lipinski permitiram avaliar que a molécula 1 apresentou um satisfatório perfil de biodisponibilidade oral. A substância nordihidroguaiarético (molécula 1, melhor ranqueada na etapa de triagem virtual) foi selecionada para a realização da simulação de dinâmica molecular com o intuito de investigar a trajetória do complexo (SARS-CoV-2 Mpro + Molécula 1) e obtenção dos gráficos de RMSD e RMSF, assim como quantificar o número de ligações de hidrogênio mantidas durante o período da DM. Além disso, os valores de energia livre calculados pelos métodos MM-GBSA e MM-PBSA corroboram a estabilidade do complexo ligante-alvo biológico de acordo com o baixo valor de ΔG também indicado pelo ranking obtida via metodologia de docking. A partir dos resultados obtidos neste trabalho, futuras análises poderão ser realizadas para avançar no entendimento dos mecanismos de ação da enzima SARS-CoV-2 Mpro e o planejamento de novos inibidores, por exemplo, informações já obtidas neste trabalho poderão guiar projetos para o desenvolvimento de novas moléculas inibidoras e potencial candidato a fármaco para o tratamento da COVID-19.

FIGURAS

Figura 1. Estrutura do SARS-CoV-2.

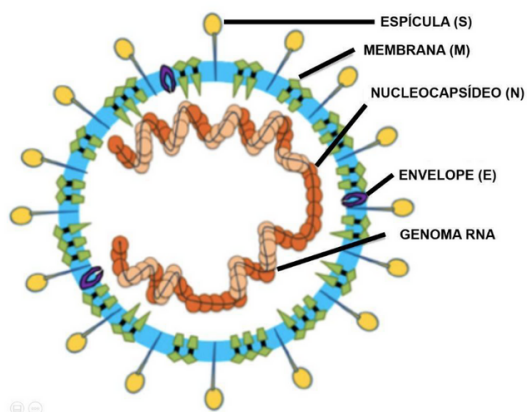


Figura 2. Estrutura dos dímeros (azul e laranja), com seus domínios (I,II,III) e resíduos do sítio catalítico (His41 e Cys145)^{ref art.}

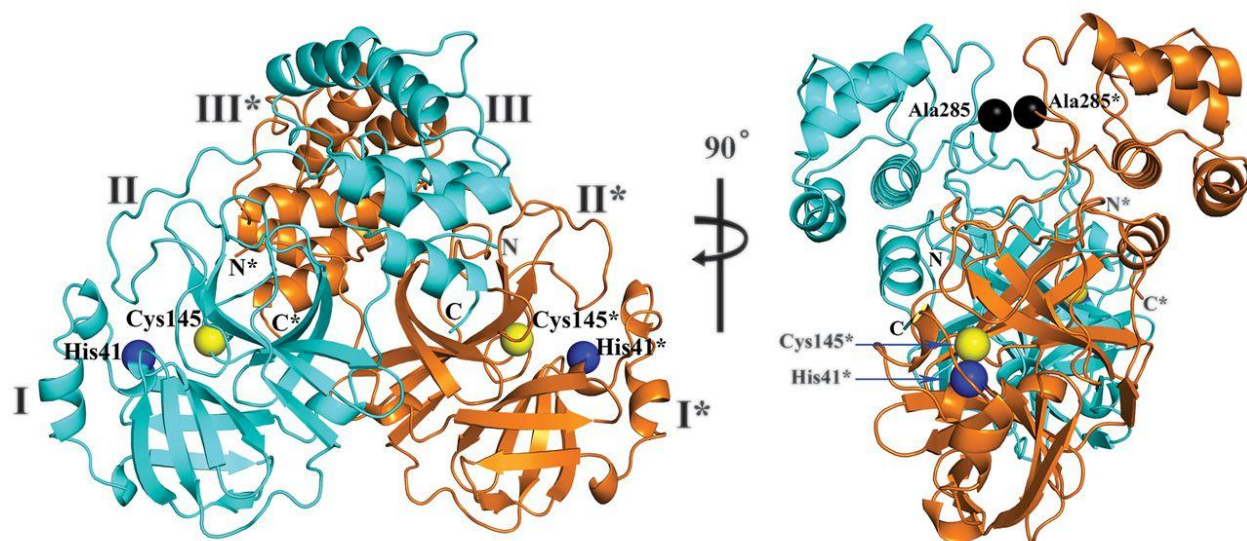


Figura 3. Resultados de redocking do ligante O6K na estrutura do SARS-CoV-2^{Mpro} (RSMD=2,32 Å).

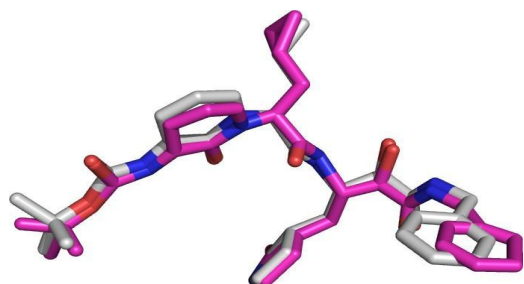
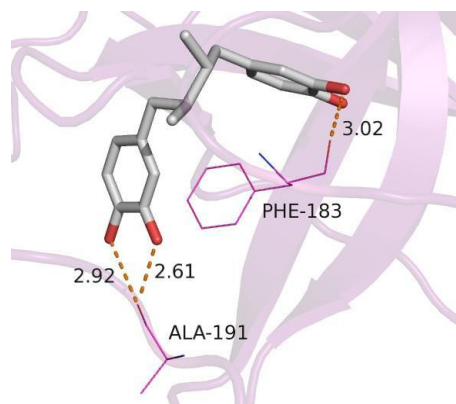
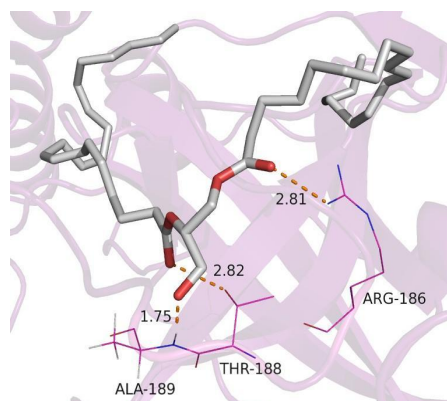


Figura 4. Análise das interações das 3 moléculas ranqueadas. (A) Molécula 1 acoplada na estrutura do SARS-CoV-2^{Mpro}; (B) Molécula 2 acoplada na protease SARS-CoV-2^{Mpro}; (C) Molécula 3 acoplada na protease SARS-CoV-2^{Mpro}

A)



B)



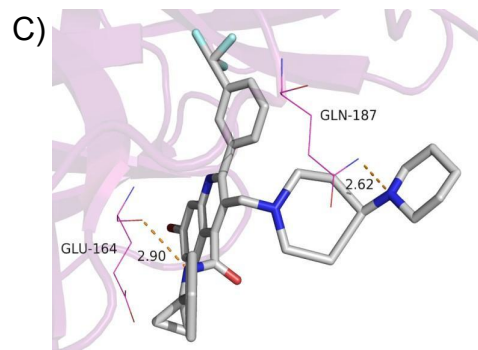
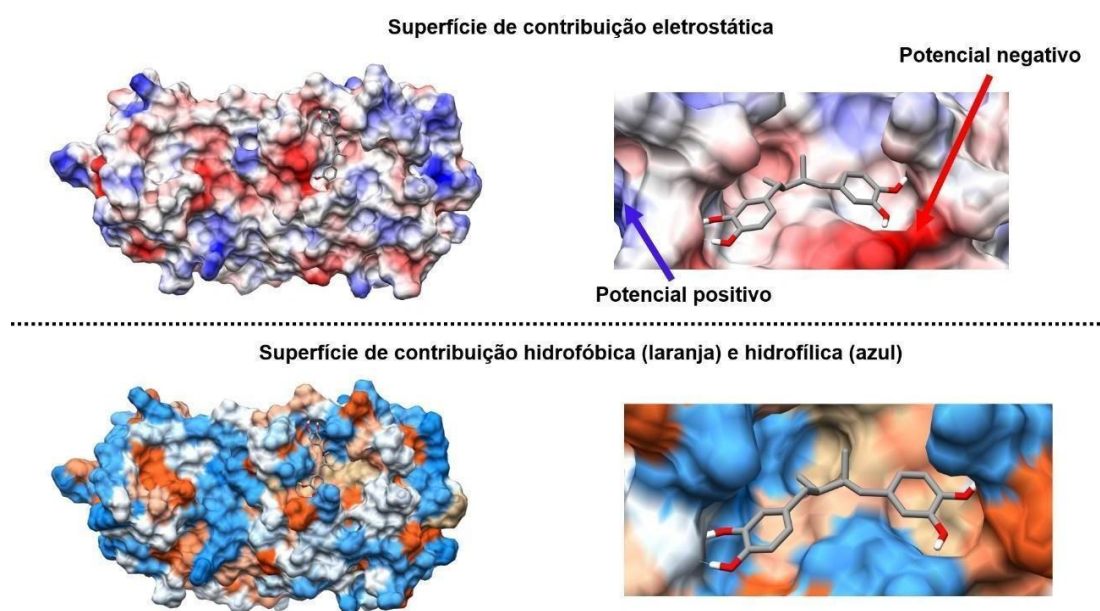


Figura 5. Superfície de contribuição eletrostática, hidrofóbica e hidrofílica para o composto melhor ranqueado (molécula 1) na triagem virtual.



GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores de RMSD do SARS-CoV-2^{MPro} na presença do inibidor (molécula 1). A cor violeta indica a proteína na forma APO (sem a presença do inibidor) e a cor preta representa o complexo (SARS-CoV-2 + Molécula 1).

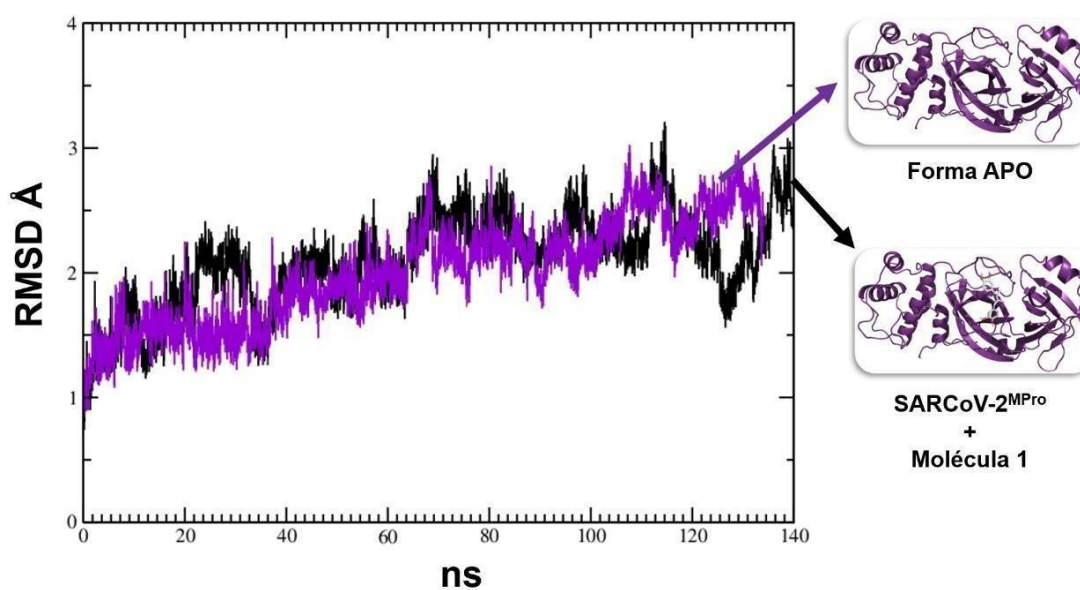


Gráfico 2. Ligações de hidrogênio observadas durante as simulações de DM para o complexo (SARS-CoV-2^{Mpro} + Molécula 1).

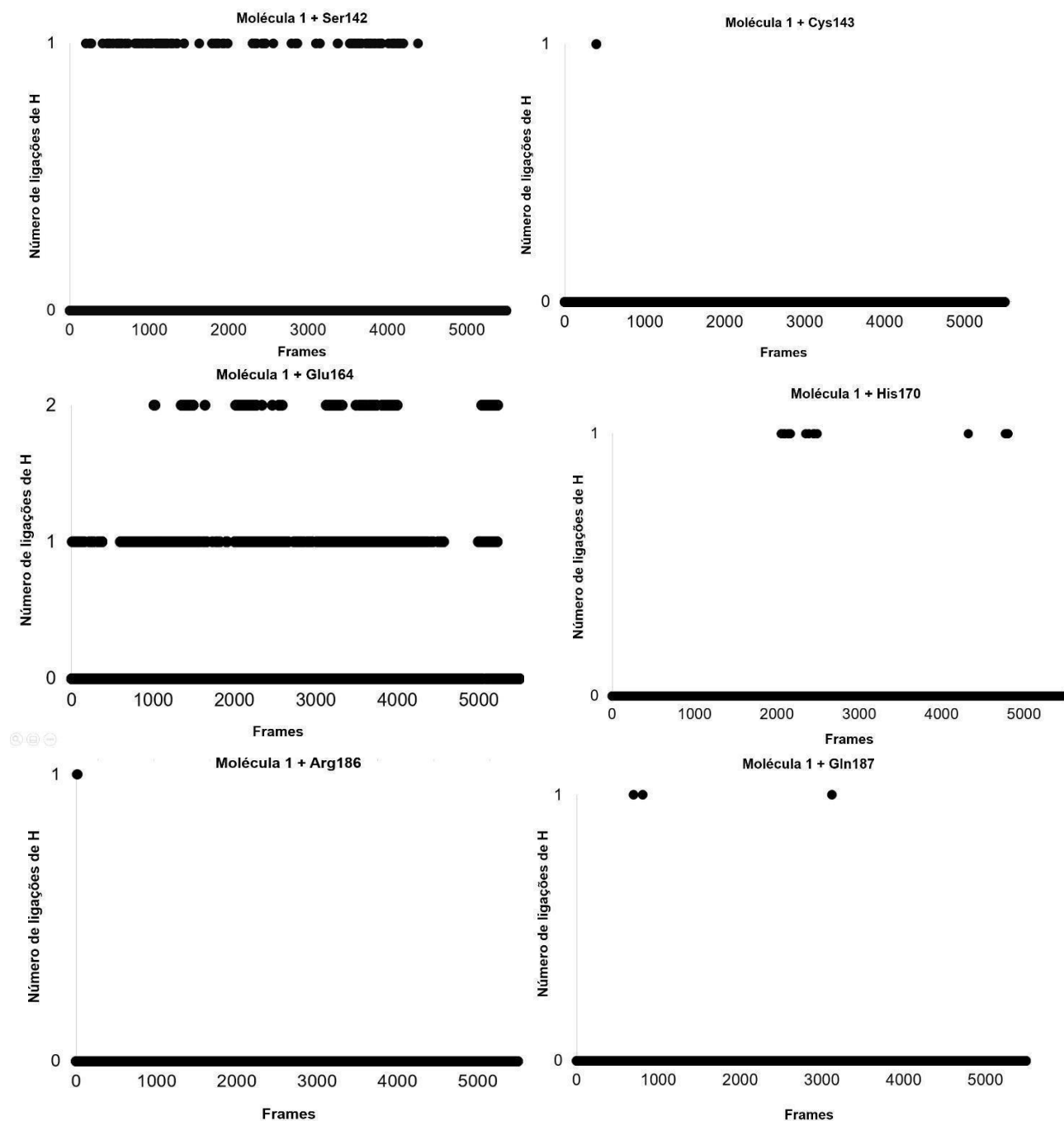
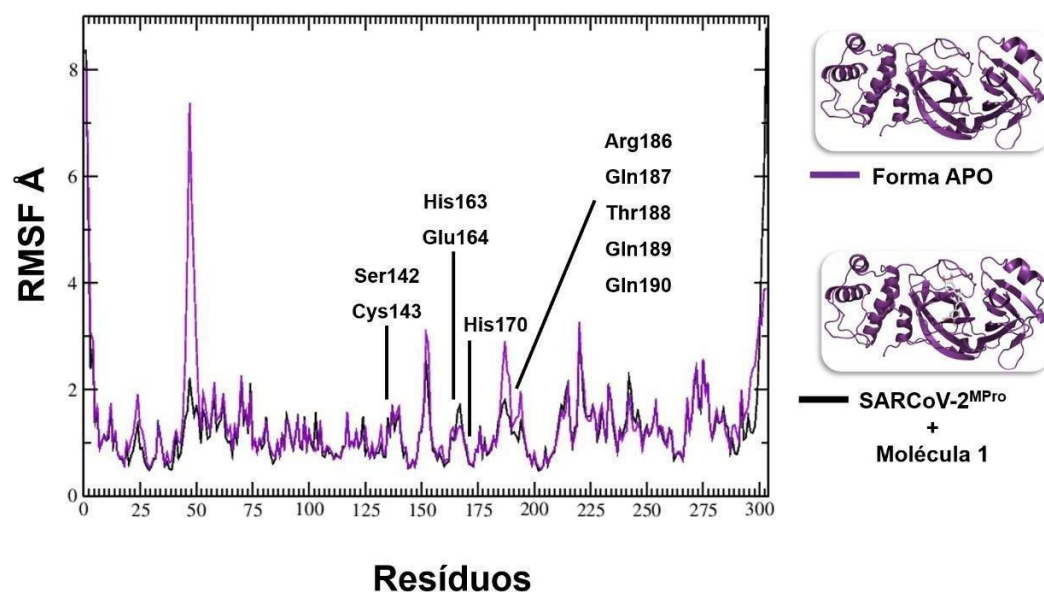


Gráfico 3. Gráfico de RMSF para o SARS-CoV-2^{Mpro} na presença do inibidor (Molécula 1). A cor violeta indica a proteína na forma APO (sem a presença do inibidor) e a linha preta representa o complexo (SARS-CoV-2 + Molécula 1).



TABELAS

Tabela 1. Valores de ΔG obtidos para os complexos ligante-alvo a partir da função de *scoring*

Molécula		ChemScore		$\Delta G/RT$ $= -RT \ln(1/K_i)$	K _i (Aprox.)
		ΔG (kcal/mol)	ΔG (kJ)		
4-[(2R,3S)-4-(3,4-Dihidro xifenil)-2-3-d	1	-42,302	-176,993	0,078	1,081

**imetilbutil]1-
2benzenodiol**

1-estearoil-2- araquidonoil- sn-glicerol	2	-36,865	-154,241	0,068	1,070
3-(1,4'-bipipe ridina-1'-ilme til)-7-bromo- N-(1-fenilcicl opropil)-2-[3- 9trifluorometi l]-4-quinoline carboxamida	3	-32,061	-134,144	0,059	1,061

Tabela 2. Propriedades ADME das moléculas em estudo

Molécula	Log S	Solubilidade	GI Absorção	<i>Lipinski</i>	Lipofilicidade (Consensus Log Po/W)
1	-4,74	8,96 10 ⁻³ mg/ml; 1,84 10 ⁻⁵ mol/l	Alta	0 violações	2,96
2	-10,47	2,18 10 ⁻⁸ mg/ml; 3,37 10 ⁻¹¹ mol/l	Baixa	2 violações MW>500 MLOGP> 4,15	9,37
3	-8,81	1,06 10 ⁻⁶ mg/ml; 1,53 10 ⁻⁹ mol/l	Baixa	2 violações MW>500 MLOGP> 4,15	7,16

Tabela 3. Valores de energia livre de ligação estimados para o sistema (SARS-CoV-2^{Mpro} + Molécula 1).

Molécula	ΔG – Energia Livre (kcal/mol)		
	ChemScore	MM-GBSA	MM-PBSA
1	-42,302	-52,45	-39,54

EQUAÇÕES EXIBIDAS

Equação 1.

$$E_{Total} = \sum \frac{1}{2} kl (l - l_o)^2 + \sum \frac{1}{2} k\theta (\theta - \theta_o)^2 + \sum \frac{1}{2} K_\varphi (1\cos(n\phi - \varphi_o))^2 + \sum 4\varepsilon \left(\frac{A}{r_{ij}^{12}} \right) - \left(\frac{B}{r_{ij}^6} \right) + \sum 4\varepsilon \left(\frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_o r_{ij}} \right)$$

INFORMAÇÕES DO AUTOR

Autor correspondente

Erica de Sousa Conrado

Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo (EACH-USP),

03828-000 São Paulo, Brasil; Email : ericaconrado@usp.br

Fontes de Financiamento

Universidade de São Paulo - PIBIC-CNPq

REFERÊNCIAS

1. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. Trends Immunol. 2020 Dec;41(12):1100-1115. doi: 10.1016/j.it.2020.10.004. Epub 2020 Oct 14. PMID: 33132005; PMCID: PMC7556779.
2. Yadad R, Parihar RD, Dhiman U, Dhamija P, Upadhyay SK, Imran M, Behera SK, Prasad TS. Docking of FDA Approved Drugs Targeting NSP-16, N-Protein and Main Protease of SARS-CoV-2 as Dual Inhibitors. Bio Interface Research. 2020 Sep; 11(3):9848-9861. doi:10.33263/BRIAC113.9849861.
3. Uzunian A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2020 Sep; 56(1):1-4 doi:10.5935/1676-2444.202200053.

4. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, Pan P, Wang W, Hu D, Liu X, Zhang Q, Wu J. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):424-432. doi: 10.1002/jmv.25685. Epub 2020 Feb 7. PMID: 31981224; PMCID: PMC7166547.
5. Sun Y, Abriola L, Niederer RO, Pedersen SF, Alfajaro MM, Silva Monteiro V, Wilen CB, Ho YC, Gilbert WV, Surovtseva YV, Lindenbach BD, Guo JU. Restriction of SARS-CoV-2 replication by targeting programmed -1 ribosomal frameshifting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jun 29;118(26):e2023051118. doi: 10.1073/pnas.2023051118. PMID: 34185680; PMCID: PMC8256030.
6. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Jun;7(6):439-50. doi: 10.1038/nrmicro2147. PMID: 19430490; PMCID: PMC2830095.
7. Zhang L, Lin D, Sun X, Curth U, Drosten C, Sauerhering L, Becker S, Rox K, Hilgenfeld R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*. 2020 Apr 24;368(6489):409-412. doi: 10.1126/science.abb3405. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32198291; PMCID: PMC7164518.
8. Dong S, Sun J, Mao Z, Wang L, Lu YL, Li J. A guideline for homology modeling of the proteins from newly discovered betacoronavirus, 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *J Med Virol*. 2020 Sep;92(9):1542-1548. doi: 10.1002/jmv.25768. Epub 2020 Mar 29. PMID: 32181901; PMCID: PMC7228330.
9. Jin Y, Yang H, Ji W, Wu W, Chen S, Zhang W, Duan G. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 2020 Mar 27;12(4):372. doi: 10.3390/v12040372. PMID: 32230900; PMCID: PMC7232198.

10. Senger MR, Evangelista TCS, Dantas RF, Santana MVDS, Gonçalves LCS, de Souza Neto LR, Ferreira SB, Silva-Junior FP. COVID-19: molecular targets, drug repurposing and new avenues for drug discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020 Oct 2;115:e200254. doi: 10.1590/0074-02760200254. PMID: 33027420; PMCID: PMC7534958.
11. Mahdi M, Mótyán JA, Szojka ZI, Golda M, Miczi M, Tőzsér J. Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2's main protease. *Virol J*. 2020 Nov 26;17(1):190. doi: 10.1186/s12985-020-01457-0. PMID: 33243253; PMCID: PMC7689640.
12. Berman HM, Kleywegt GJ, Nakamura H, Markley JL. The Protein Data Bank archive as an open data resource. *J Comput Aided Mol Des*. 2014 Oct;28(10):1009-14. doi: 10.1007/s10822-014-9770-y. Epub 2014 Jul 26. PMID: 25062767; PMCID: PMC4196035.
13. Jarvis, L., Biopharmaceuticals - Merck biologics. *In: Chemical & Engineering News*, nº 84, 2020, p. 10-10.
14. Verdonk ML, Cole JC, Hartshorn MJ, Murray CW, Taylor RD. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*. 2003 Sep ;52(4):609-23. doi: 10.1002/prot.10465. PMID: 12910460.
15. Sybyl 8.1, Tripos Inc. St . Louis, USA, 2009.
16. Ferreira, R. S.; Glaucius, O.; Andricopulo, A. D., Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. *In. Química Nova*, 2011 Dez; 34 (10): 1770-1778. doi: 10.1590/S0100-40422011001000010.

17. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 2004 Dec;1(4):337-41. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007. PMID: 24981612.
18. Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep* 7, 42717 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
19. Böckmann RA, Grubmüller H. Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F1-ATP synthase. *Nat Struct Biol.* 2002 Mar;9(3):198-202. doi: 10.1038/nsb760. PMID: 11836535.
20. Prigogine, I.; Rice, S. A., *Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure, and thermodynamics*. John Wiley & Sons: 1990; Vol. 86.
21. Durrant JD, McCammon JA. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* 2011 Oct 28;9:71. doi: 10.1186/1741-7007-9-71. PMID: 22035460; PMCID: PMC3203851.
22. A. D. McLean, G. S. Chandler; Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, $Z=11-18$. *J. Chem. Phys.* 15 May 1980; 72 (10): 5639–5648. <https://doi.org/10.1063/1.438980>.
23. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004 Oct;25(13):1605-12. doi: 10.1002/jcc.20084. PMID: 15264254.
24. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph.* 1996 Feb;14(1):33-8, 27-8. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID: 8744570.
25. Genheden S, Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin Drug Discov.* 2015 May;10(5):449-61. doi:

10.1517/17460441.2015.1032936. Epub 2015 Apr 2. PMID: 25835573; PMCID: PMC4487606.

26. Namba AM ,da Silva VB, da Silva CHTP, Molecular dynamics: theory and applications in drug design. *Eclética Química*, n° 33, 2008, p.13-24.doi:10.1590/S0100-46702008000400002.
27. Böckmann, R., Grubmüller, H. Nanoseconds molecular dynamics simulation of primary mechanical energy transfer steps in F1-ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol* 9, 198–202 (2002). doi: 10.1038/nsb760.