

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA

Rafael Mariano Neto

**AVALIAÇÃO MOLECULAR IN SILICO DE FÁRMACOS ANTIVIRAIS  
COMERCIAIS PARA INIBIÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEASE  
PRINCIPAL DO SARS-COV-2**

UBERLÂNDIA - MG

2023

**AVALIAÇÃO MOLECULAR IN SILICO DE FÁRMACOS ANTIVIRAIS  
COMERCIAIS PARA INIBIÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEASE  
PRINCIPAL DO SARS-COV-2**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção título de Bacharel em Química Industrial.

**Orientador:** Guedmiller Souza de Oliveira

UBERLÂNDIA

2023

**AVALIAÇÃO MOLECULAR IN SILICO DE FÁRMACOS ANTIVIRAIS  
COMERCIAIS PARA INIBIÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEASE  
PRINCIPAL DO SARS-COV-2**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção título de Bacharel em Química Industrial.

Banca Examinadora

---

Prof. Amanda Danuello Pivatto  
Instituto de Química - UFU

---

Prof. Eduardo de Faria Franca  
Instituto de Química - UFU

---

Prof. Gustavo Von Poelhsitz  
Instituto de Química - UFU

Uberlândia  
Junho 2023

# Agradecimentos

Agradeço primeiramente a meus pais, Sirlete e Marcos, pela liberdade e confiança por sempre me proporcionarem as melhores oportunidades para que eu pudesse fazer as minhas próprias escolhas.

Agradeço também a meus amigos que sempre me acompanharam tanto no ensino médio quanto na faculdade, por acreditarem em mim e me apoiarem até os dias atuais. Um agradecimento especial à minha namorada Amanda que me acompanha desde o início do curso sendo a pessoa que mais me ajudou a chegar onde cheguei.

Também agradeço ao Professor Guedmiller que me deu a oportunidade de conhecer essa área da química computacional que me proporcionou muitas conquistas.

*”A maior falha da humanidade pertence àqueles que acreditam que a sua visão do que é real é a única verdade.” - Flea*

# Resumo

Este trabalho visa a avaliação molecular de compostos antivirais utilizados comercialmente para inibição da proteína do vírus da COVID-19 por intermédio de técnicas computacionais. Pouco se sabe sobre os sítios interativos da protease principal do SARS-CoV-2, portanto, uma investigação computacional pode trazer informações cruciais acerca das regiões da proteína passíveis de inibição com fármacos. A princípio, foram investigados agentes antivirais conhecidos e vendidos comercialmente, tais como: Baloxavir marboxil (Xofluza), Oseltamivir (Tamiflu) e Zanamivir (Relenza). Do ponto de vista científico, estes fármacos antivirais são inócuos contra o vírus, porém, modificações moleculares nos mesmos, podem resultar em estruturas mais atrativas e ativas na inibição do vírus. Essa engenharia molecular pode ser facilmente proposta utilizando programas de computador, que fazem o desenho molecular desejado. Experimentalmente, a viabilidade dessas modificações nos fármacos precisam ser verificadas, sendo de fundamental importância as colaborações com grupos experimentais. Para este estudo, a macromolécula alvo será a protease principal do SARS-CoV-2, disponível no repositório de proteínas (PDB ID: 6Y2F). As posições obtidas dos ligantes foram submetidas a simulações por dinâmica molecular (DM) para equilibrar o sistema. A partir dos resultados obtidos diante deste trabalho conclui-se que os fármacos Baloxavir, Oseltamivir e Zanamivir apresentaram maiores afinidades com as proteínas selecionadas, apresentando valores de energia de ligação abaixo de -8.0 kcal/mol. Portanto, o reposicionamento ou a substituição de grupos funcionais pré-selecionados dos fármacos analisados pode ser uma alternativa para o tratamento da Covid-19, pois a afinidade molecular dos fármacos com as proteínas do vírus obteve resultados satisfatórios.

**Palavras-chave:** Simulação computacional, Dinâmica molecular, Inibidores, QM/MM, SARS-CoV-2.

# Abstract

This work aims at the molecular evaluation of antiviral compounds commercially used to inhibit the COVID-19 virus protein through computational techniques. Little is known about the interactive sites of the main protease of SARS-CoV-2, therefore, a computational investigation can bring crucial information about the regions of the protein that can be inhibited with drugs. At first, known and commercially sold antiviral agents were investigated, such as: Baloxavir marboxil (Xofluza), Oseltamivir (Tamiflu) and Zanamivir (Relenza). From a scientific point of view, these antiviral drugs are innocuous against the virus, however, molecular modifications in them may result in structures that are more attractive and active in inhibiting the virus. This molecular engineering can be easily proposed using computer programs, which make the desired molecular design. Experimentally, the viability of these changes in drugs needs to be verified, with collaborations with experimental groups being of fundamental importance. For this study, the target macromolecule will be the main protease of SARS-CoV-2, available in the protein repository (PDB ID: 6Y2F). The obtained positions of the ligands were submitted to simulations by molecular dynamics (DM) to balance the system. Based on the results obtained in this work, it is concluded that the drugs Baloxavir, Oseltamivir and Zanamivir showed greater affinities with the selected proteins, with binding energy values below -8.0 kcal/mol. Therefore, the repositioning or replacement of pre-selected functional groups of the analyzed drugs may be an alternative for the treatment of Covid-19, as the molecular affinity of the drugs with the virus proteins obtained satisfactory results.

**Palavras-chave:** Computer simulation, Molecular dynamics, Inhibitors, QM/MM, SARS-CoV-2.

# Objetivo

O objetivo do trabalho é estudar os fármacos Baloxavir, Oseltamivir e Zanamivir que foram cogitados a serem uma alternativa preventiva à inibição do novo coronavírus utilizando modelagem molecular, docking molecular, dinâmica molecular e mecânica quântica, para que na ausência de medicamentos comerciais eficazes contra o vírus SARS-CoV-2, o reaproveitamento de medicamentos seja uma opção imediata em relação à busca de uma contramedida.



# Lista de ilustrações

Figura 1 – Estrutura cristalina da SARS-CoV-2.....	17
Figura 2 – Estrutura dos ligantes Baloxavir, Oseltamivir e Zanamivir.....	18
Figura 3 – Principais etapas para o docking molecular (Adaptado de MORRIS et al., 2001). .....	19
Figura 4 – Representação da interação receptor, proteína e ligante (Adaptado de MORRIS et al., 2012).....	20
Figura 5 – Região de melhor posição dos ligantes obtida pelo Blind Docking .....	22
Figura 6 – Características estruturais do monômero da principal protease do SARSCoV-2 e seu sítio ativo .....	24
Figura 7 – Etapas da simulação da dinâmica molecular (Adaptado de <a href="https://www.r-ccs.riken.jp/">https://www.r-ccs.riken.jp/</a> , Acesso em 17/05/2023).....	27
Figura 8 – A configuração do bind docking feita pelo DockThor ( <a href="https://www.dockthor.lncc.br">https://www.dockthor.lncc.br</a> ) utilizou da seguinte configuração de grade: .....	28
Figura 9 – Melhores frames de trajetória para ligações de hidrogênio em cada ligante.....	30
Figura 10 – Resultado da box calculada pelo DockThor para a análise do docking do Oseltamivir, Baloxavir e Zanamivir respectivamente:.....	30
Figura 11 – Interação HOMO e LUMO do baloxavir com a proteína da Covid-19.....	34
Figura 12 – Interação HOMO e LUMO do oseltamivir com a proteína da Covid-19.....	34
Figura 13 – Interação HOMO e LUMO do zanamivir com a proteína da Covid-19.....	35

# Lista de tabelas

Tabela 1 – Quantidade de ligações de hidrogênio por ligante.....	28
Tabela 2 – Análise do docking molecular para o ligante Baloxavir.....	32
Tabela 3 – Análise do docking molecular para o ligante Oseltamivir.....	32
Tabela 4 – Análise do docking molecular para o ligante Zanamivir.....	32
Tabela 5 – Parâmetros de afinidade molecular dos fármacos com a proteína do covid-19 (6Y2F).....	32

# Lista de Abreviaturas

DM - Dinâmica Molecular

PDB - Banco de Dados de Proteína

PSF - Arquivo de Estrutura de Proteína

RCSB - Pesquisa Colaborativa para Bioinformática Estrutural

CHARMM - Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics

NAMD - Nanoscale Molecular Dynamics

QM - Mecânica Quântica

VMD - Visual Molecular Dynamics

DM - Dinâmica Molecular

HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital - Orbital Molecular mais Elevado Ocupado

LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital - Orbital Molecular mais Baixo Não Ocupado

GAP - Lacuna de Energia

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução e Justificativa.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Desenvolvimento.....</b>	<b>13</b>
2.1	Revisão teórica e Metodologia.....	13
2.1.1	Baloxavir.....	13
2.1.2	Oseltamivir.....	14
2.1.3	Zanamivir.....	16
2.1.4	Preparação dos Ligantes da Proteína.....	17
2.1.5	Docking Molecular.....	19
2.2	Campo de Força.....	22
2.3	Sítio Ativo.....	24
2.4	Dinâmica Molecular.....	25
2.5	Ligações de Hidrogênio.....	26
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussões.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Referências.....</b>	<b>37</b>

# 1 Introdução e Justificativa

No dia 31 de dezembro de 2019, vários casos de pneumonia foram registrados na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China. Uma semana depois, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi alertada sobre um novo tipo de coronavírus, sendo que, até esse momento, outros seis coronavírus humanos (HCoV) já haviam sido registrados, porém que ocasionalmente causavam doenças graves, são eles: HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-COV e o MERS-COV. Porém, até as últimas décadas, ocasionalmente causavam doenças graves em humanos. Vinte dias depois, a OMS declarou o mais alto nível de alerta em relação ao surto do novo coronavírus visando interromper a propagação do vírus. A situação global emergente causada pelo Covid-19 alarmou cientistas em todo o mundo para desenvolver rapidamente vacinas para imunizar as pessoas, a fim de salvar vidas. No entanto, um medicamento capaz de eliminar os efeitos colaterais da Covid-19 ainda não está disponível. O processo de implantação de medicamentos nas farmácias pode ser um gargalo para as pessoas que estão sofrendo.<sup>1</sup>

Tamiflu, Relenza e Xofluza são drogas antivirais que têm sido usadas no tratamento da gripe. A pandemia de COVID-19 de 2020 levou à investigação da eficácia dessas drogas contra o SARS-Cov-2, o vírus que causa a doença. A proteína spike é uma das principais proteínas de superfície do vírus e é responsável por sua entrada nas células hospedeiras. Portanto, a interação entre as drogas e a proteína spike é um aspecto crítico para avaliar sua eficácia contra o vírus. Além dos medicamentos comerciais já mencionados, outros compostos também foram investigados quanto à sua eficácia contra o SARS-CoV-2 usando técnicas computacionais. Um exemplo é a cloroquina, um medicamento originalmente utilizado para tratar a malária que também foi proposto como um potencial tratamento para a COVID-19. No entanto, estudos clínicos posteriores não mostraram benefícios significativos da cloroquina no tratamento da doença.<sup>2</sup>

É importante lembrar que, embora medicamentos e vacinas sejam fundamentais na luta contra a COVID-19, medidas de prevenção como distanciamento social, uso de máscaras e higiene adequada das mãos também são essenciais para controlar a disseminação do vírus. O reaproveitamento de medicamentos é uma estratégia que vem sendo cada vez mais explorada no contexto da COVID-19. Além dos medicamentos comerciais já existentes, outras substâncias

que foram originalmente desenvolvidas para tratar outras doenças também estão sendo testadas quanto à sua eficácia contra o SARS-CoV-2. Por exemplo, a ivermectina, um medicamento usado para tratar infecções parasitárias, tem sido amplamente discutida como uma possível opção de tratamento para a COVID-19. No entanto, ainda há poucos estudos clínicos bem controlados que demonstrem a eficácia da ivermectina no tratamento da doença. Embora o reaproveitamento de medicamentos ofereça uma opção promissora para combater a COVID-19, é importante lembrar que essa estratégia não substitui a necessidade de desenvolver novas drogas especificamente para tratar a doença. Além disso, é importante garantir que esses medicamentos reaproveitados sejam seguros e eficazes para uso em pacientes com COVID-19, o que requer estudos clínicos bem controlados. <sup>3</sup>

Os resultados aqui observados, mostraram que este estudo pode estimular a investigação de outros medicamentos comerciais para serem usados como moléculas precursoras contra a COVID-19. Portanto, o objetivo desse projeto é que na ausência de medicamentos comerciais eficazes contra o vírus SARS-CoV-2, o reaproveitamento de medicamentos é uma opção imediata em relação à busca de uma contramedida.

## 2 Desenvolvimento

### 2.1 Revisão teórica e Metodologia

#### 2.1.1 Baloxavir

O baloxavir marboxil é um fármaco utilizado para o tratamento da influenza, também conhecida como gripe, o baloxavir marboxil é um inibidor da endonuclease dependente de cap, uma proteína viral fundamental para a replicação do vírus influenza. Foi aprovado para uso nos Estados Unidos em 2018, após estudos clínicos que demonstraram sua eficácia contra diferentes cepas do vírus influenza. Uma das vantagens do baloxavir marboxil em relação a outros antivirais para a influenza, como a oseltamivir, é a sua rápida ação, com redução da carga viral em um período mais curto de tempo. O baloxavir marboxil tem um perfil de segurança favorável e tem sido bem tolerado em ensaios clínicos, no entanto, é importante monitorar a resistência viral ao baloxavir marboxil, e continuar a investigar seu uso para o tratamento da influenza. <sup>4</sup>

O baloxavir demonstra atividade contra os vírus da influenza A, B, C e D, incluindo os vírus resistentes aos inibidores de neuraminidase. Os vírus da influenza B são menos sensíveis ao baloxavir em comparação com os vírus da influenza. A ordem de suscetibilidade é a seguinte: influenza A > B > C > D. Foram relatados efeitos sinérgicos entre o baloxavir e o inibidor de neuraminidase oseltamivir em estudos *in vitro* e em camundongos. Atualmente, está em andamento um ensaio clínico de fase 3 com o baloxavir para avaliar sua eficácia e segurança em combinação com um inibidor de neuraminidase padrão de cuidados (oseltamivir, peramivir ou zanamivir) em pacientes hospitalizados com idade igual ou superior a 12 anos que apresentam influenza grave. Embora o baloxavir marboxil seja um medicamento aprovado para o tratamento da gripe, não há evidências suficientes até o momento para afirmar sua eficácia no tratamento da COVID-19. <sup>5</sup>

São necessários mais estudos para avaliar a eficácia do baloxavir marboxil no tratamento da COVID-19 em seres humanos. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não recomenda o uso de baloxavir marboxil no tratamento da COVID-19.

### 2.1.2 Oseltamivir

O oseltamivir é um fármaco antiviral utilizado no tratamento da gripe. Ele age inibindo a neuraminidase, uma enzima que é essencial para a replicação viral e a disseminação da infecção. O oseltamivir é comercializado sob a forma de cápsulas e é mais eficaz se administrado logo após o início dos sintomas, no entanto, o uso indiscriminado do oseltamivir pode levar ao desenvolvimento de resistência viral. Um estudo de vigilância realizado em 20 países identificou uma proporção crescente de cepas de vírus da gripe resistentes ao oseltamivir ao longo do tempo.<sup>6</sup>

No Brasil, o oseltamivir é um medicamento registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para tratamento da gripe. O Ministério da Saúde recomenda o uso do oseltamivir em pacientes com sintomas de gripe que apresentem risco aumentado de complicações, como idosos, gestantes, crianças menores de 2 anos e pessoas com doenças crônicas. O uso do oseltamivir pode ser indicado para prevenir a propagação da gripe em casos de surtos ou epidemias, em conjunto com outras medidas de controle de infecção, como a higiene das mãos e o uso de máscaras. Embora o oseltamivir tenha sido desenvolvido para o tratamento da gripe, não é eficaz contra o coronavírus SARS-CoV-2, que causa a COVID-19. O SARS-CoV-2 pertence a uma família de vírus diferente daqueles que causam a gripe, e possui uma estrutura e mecanismos de replicação distintos.<sup>7</sup>

Até 2020, não existia nenhum medicamento antiviral aprovado especificamente para o tratamento da COVID-19. No entanto, alguns fármacos têm sido utilizados em caráter experimental para reduzir a gravidade da doença ou prevenir sua progressão em pacientes hospitalizados, como a remdesivir e a dexametasona.<sup>8</sup>

### 2.1.3 Zanamivir

O zanamivir é um fármaco antiviral utilizado no tratamento da gripe, atuando como inibidor da neuraminidase viral, uma enzima que é essencial para a liberação de novas partículas virais. Este medicamento é comercializado sob o nome Relenza e é administrado por inalação oral. De acordo com um estudo clínico randomizado controlado por placebo, o zanamivir reduziu a duração da doença em cerca de um dia e meio em pacientes adultos com sintomas de



gripe. Além disso, também reduziu a duração dos sintomas em crianças e adultos infectados com o vírus da gripe A (H1N1) de 2009<sup>9</sup>. Ele é utilizado no tratamento da gripe causada pelos vírus influenza A e B em adultos e crianças acima de 5 anos de idade. O Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Imunizações, também recomenda o uso de zanamivir para a profilaxia da gripe em situações especiais, como em ambientes hospitalares e em pessoas com alto risco de complicações decorrentes da infecção por influenza. Atualmente, não há evidências científicas que comprovem a eficácia do zanamivir no tratamento da COVID-19. O tratamento atualmente recomendado para a COVID-19 varia de acordo com a gravidade dos sintomas e pode incluir medicamentos antivirais específicos, como o remdesivir, e medicamentos para controlar os sintomas, como analgésicos e antitérmicos.<sup>10</sup>

No entanto, o uso de zanamivir pode ser considerado em caso de coinfeção por influenza em pacientes com COVID-19, já que a infecção por influenza pode aumentar a gravidade da COVID-19 e vice-versa. Nesses casos, o uso de zanamivir deve ser avaliado cuidadosamente pelo médico responsável pelo tratamento do paciente, levando em consideração os possíveis riscos e benefícios.

#### 2.1.4 Preparação dos ligantes e da proteína

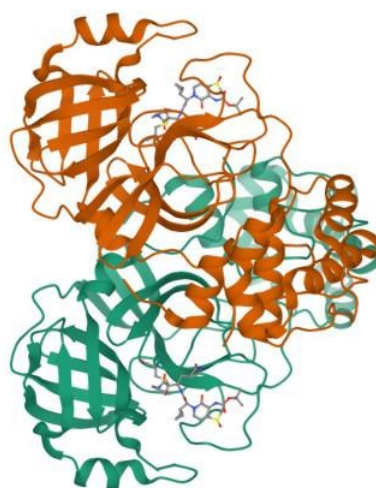
O RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) Protein Data Bank (PDB) é um repositório de dados de estruturas moleculares de proteínas e outros macromoléculas biológicas, como ácidos nucleicos e complexos macromoleculares. O PDB contém informações detalhadas sobre a estrutura tridimensional das moléculas, incluindo sua conformação, ligações químicas e interações moleculares.<sup>11</sup>

Os dados da proteína SARS-CoV-2 spike (6Y2F), apresentado na Figura 1, e dos ligantes, Figura 2, como Baloxavir, Oseltamivir e Zanamivir, usados neste estudo foram obtidos a partir do RCSB PDB. O PDB fornece acesso aberto aos dados de estruturas moleculares, permitindo que pesquisadores em todo o mundo possam fazer download e utilizar esses dados em suas pesquisas. O acesso a esses dados é fundamental para a realização de estudos de docking molecular e simulações de dinâmica molecular, como os realizados neste estudo.

Além do RCSB PDB, existem outros repositórios de dados de estruturas moleculares

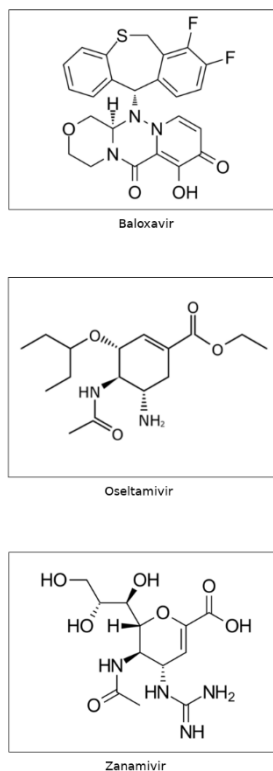
disponíveis, como o Protein Data Bank Europe (PDBe) e o Protein Data Bank Japan (PDBj). Esses repositórios também fornecem acesso aberto aos dados de estruturas moleculares e são fontes importantes de informações para a pesquisa biomolecular. O uso de repositórios de dados como o RCSB PDB é crucial para a realização de estudos de biologia estrutural e química computacional. Esses dados permitem que os pesquisadores investiguem a interação de moléculas com proteínas e outras macromoléculas biológicas em nível atômico, o que é fundamental para o desenvolvimento de novas drogas e tratamentos para doenças como a COVID-19.

Figura 1 – Estrutura cristalina da SARS-CoV-2



Fonte: RCSB PDB

Figura 2 – Estrutura dos ligantes Baloxavir, Oseltamivir e Zanamivir.



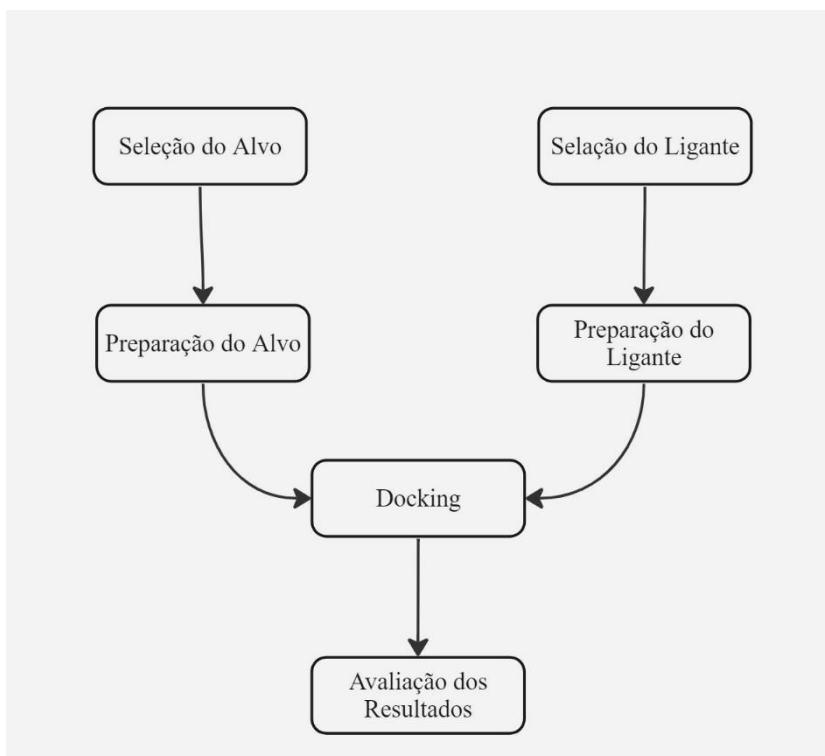
Fonte: RCSB PDB

### 2.1.5 Docking Molecular

O "Docking" é uma técnica de computação que possibilita a predição de como diferentes substratos se ligarão em várias posições. Essa técnica é frequentemente utilizada na investigação e criação de medicamentos para entender como ocorrem as interações entre proteínas e substâncias que se ligam a elas. O principal propósito de uma metodologia de docking é prever as maneiras pelas quais pequenas moléculas se ligarão dentro da região de ligação do alvo em questão, fornecendo informações detalhadas em nível atômico sobre as características físico-químicas mais importantes relacionadas ao processo de ligação. Um programa de docking se baseia em um algoritmo de busca e uma função de pontuação para prever as posições de ligação e avaliar sua qualidade. Algumas funções foram desenvolvidas para distinguir entre compostos ativos e inativos, ou para prever a afinidade de ligação absoluta entre complexos proteína-ligante. Embora a predição de ligantes pequenos e moderadamente flexíveis seja bem-sucedida na maioria dos programas de docking, a previsão do modo de

ligação nativo de ligantes altamente flexíveis, como peptídeos, e a estimativa da afinidade de ligação ainda representam importantes desafios enfrentados pela maioria desses programas.<sup>12</sup>

Figura 3 – Principais etapas para o docking molecular (Adaptado de MORRIS et al., 2001).

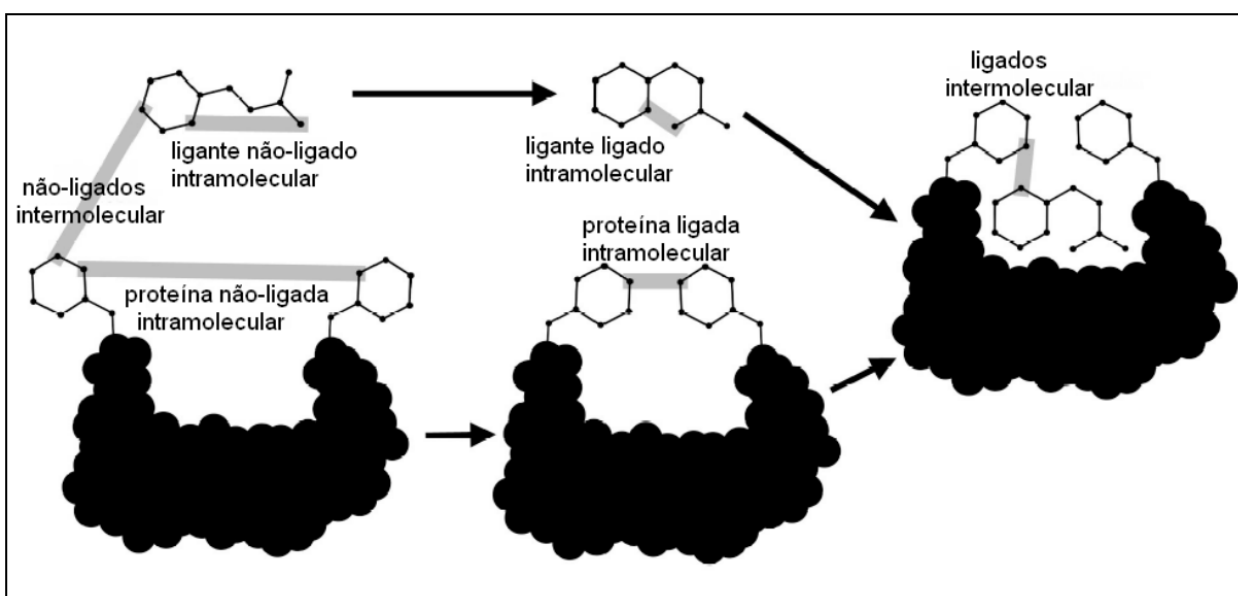


O DockThor Docking foi criado especialmente para lidar com ligantes altamente flexíveis e é altamente eficiente em acoplar peptídeos altamente flexíveis. Os ligantes passaram por um tratamento especial para gerar conformações distintas como apresentado na Figura 3. A plataforma DockThor-VS está integrada à plataforma brasileira de supercomputadores SDumont e permite experimentos de triagem virtual com até 200 compostos para usuários convidados e 5.000 compostos para projetos registrados.<sup>13</sup> Para cada sistema, foi utilizado o método de Blind Docking, que envolve o encaixe de um ligante em toda a superfície de uma proteína sem qualquer conhecimento prévio do local de ligação. Esse método requer várias tentativas/execuções e cálculos de energia antes que uma pose favorável do complexo proteína-ligante seja encontrada. No caso em questão, os resultados foram coletados a partir da melhor posição obtida pelo Blind Docking, que foi semelhante para todos os ligantes.<sup>14</sup>

O *scoring* é responsável por avaliar a energia livre de ligação de forma

computacionalmente viável, a fim de encontrar o modo de ligação com maior afinidade. Isso é feito através de pré-cálculo dos potenciais de afinidade de cada átomo do ligante em relação à região da enzima onde ocorrerá o acoplamento. A biomolécula é posicionada em uma grade tridimensional que possui um "probe atom" para investigar os pontos da grade onde a enzima está imersa, criando assim uma grade de afinidade para cada átomo do ligante em relação aos átomos da enzima como apresentado na Figura 4. Esse processo permite avaliar a energia de ligação rapidamente.<sup>15</sup>

Figura 4 – Representação da interação receptor, proteína e ligante (Adaptado de MORRIS et al., 2012).



A avaliação da energia livre de ligação ocorre em dois passos. O primeiro passo envolve a avaliação da energia intramolecular necessária para que o ligante e a proteína façam a transição de um estado desligado para a conformação ligada. Já o segundo passo envolve a avaliação da energia intermolecular necessária para que o ligante e a proteína se unam em sua conformação ligada. Essa avaliação é realizada por meio da utilização de um modelo de força de campo durante as simulações de docking.<sup>16</sup>

Sendo que a energia livre de ligação é calculada como:

$$\Delta G = \left( V_{\text{ligados}}^{L-L} - V_{\text{não ligados}}^{L-L} \right) + \left( V_{\text{ligados}}^{P-P} - V_{\text{não ligados}}^{P-P} \right) + \left( V_{\text{ligados}}^{P-L} - V_{\text{não ligados}}^{P-L} + \Delta S_{\text{conf}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde L se refere ao ligante e P se refere à proteína no complexo proteína-ligante.

Cada um dos termos de energia em pares é composto por avaliações que levam em consideração a interação entre as moléculas envolvidas em relação à dispersão/repulsão, ligação de hidrogênio, força eletrostática e remoção do solvente.

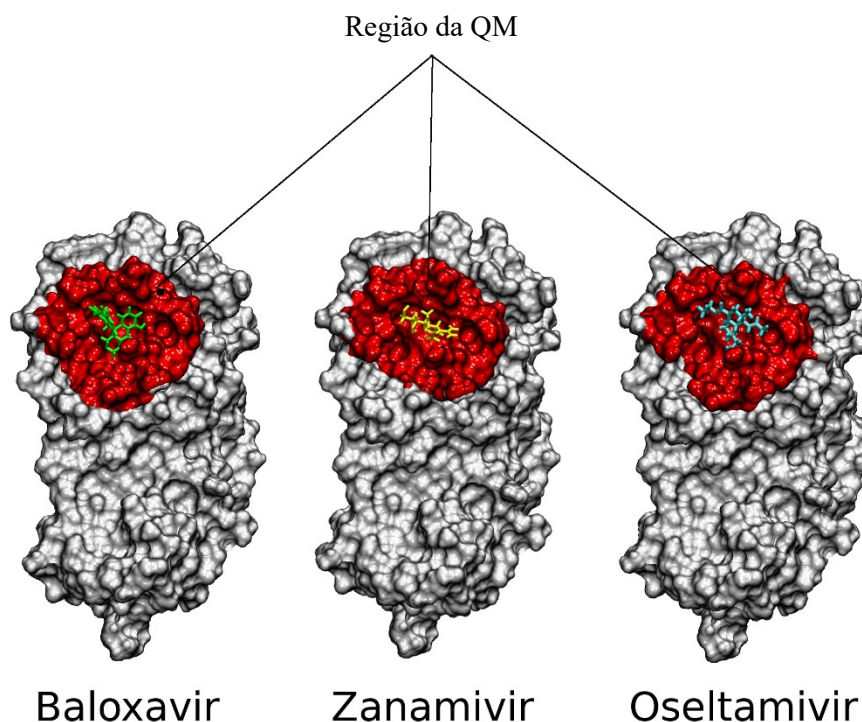
$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{bond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)}$$

Equação 2

Os valores de W são constantes que determinam a importância relativa de diferentes contribuições energéticas e são ajustados para calibrar a energia livre empírica usando constantes de ligação experimentais. O primeiro termo usa potenciais 6/12 de Lenard-Jones para descrever as interações de atração e repulsão e usa parâmetros do campo de força AMBER. O segundo termo refere-se às ligações de hidrogênio e usa potenciais 10/12. Os parâmetros C e D são definidos de forma a permitir que a profundidade máxima do poço das ligações de hidrogênio entre o oxigênio e o nitrogênio seja de 5 kcal/mol a uma distância de 1,9 Å, enquanto que para as ligações de hidrogênio entre o oxigênio e o enxofre, a profundidade máxima do poço seja de 1 kcal/mol a uma distância de 2,5 Å. O termo E(t) refere-se ao ângulo ideal de ligação de hidrogênio. O último componente é uma função de energia que representa a dessolvatação de um átomo específico, baseada no volume dos átomos vizinhos que o cercam e o protegem do solvente. Esse componente é influenciado por um parâmetro de solvatação e um fator de ponderação de distância exponencial que é fixado em 3,5Å.<sup>17</sup>

Para cada sistema estudado, utilizou-se a técnica de Docking Cego (Blind Docking), que consiste em encaixar um ligante em toda a superfície de uma proteína sem informações prévias do sítio de ligação. Essa abordagem demanda diversas tentativas e cálculos de energia antes de se obter uma conformação favorável do complexo proteína-ligante. Os resultados foram coletados a partir da melhor posição obtida pelo Docking Cego, a qual se mostrou semelhante para todos os ligantes avaliados, conforme ilustrado na Figura 6. Essa metodologia é amplamente utilizada em estudos de descoberta de fármacos, pois permite avaliar a interação entre moléculas de forma rápida e eficiente. Ademais, a utilização de softwares especializados para Docking Cego tem sido uma estratégia promissora para o reposicionamento de fármacos já aprovados para outras doenças, como é o caso do SARS-CoV-2.

Figura 5: Região de melhor posição dos ligantes obtida pelo Blind Docking.



Fonte: O autor

Onde QM Region corresponde ao sítio ativo da proteína da SARS-CoV-2, onde há uma maior afinidade molecular entre proteína e ligante.

## 2.2 Campo de Força

Com a obtenção do arquivo de estrutura da proteína (PSF), se faz necessária a escolha de um campo de força para que os dados estruturais evoluam para dados de conectividade dos 3 ligantes e para que a mecânica quântica clássica possa ser utilizada. Para sanar esse problema, foi escolhido o Campo de Força Geral CHARMM na qual é um campo de força orgânico explicitamente destinado a simular moléculas semelhantes a drogas em um ambiente biológico representado pelos campos de força biomoleculares aditivos CHARMM<sup>18</sup>. O potencial de interação entre as partículas que compõe o sistema é calculado com base em parâmetros tabelados para cada uma delas e então calcula-se a força resultante sobre cada partícula através do gradiente do potencial:

$$\boxed{F_i = -\nabla U_i} \quad \text{Equação 3}$$

onde  $F_i$  é a força resultante sobre a partícula  $i$  e o potencial  $U_i$  é a soma de todas as interações de pares entre a partícula  $i$  e as demais partículas do sistema, sendo essas divididas em interações ligantes, relacionadas com a energia de estiramento de ligações, deformações angulares e rotação de diedros, e interações não-ligantes, ou seja, interações entre a partícula  $i$  e todas as partículas com as quais não possui interação de ligação, ângulo ou diedro:

$$\boxed{U_{\text{pares}} = \sum U_{\text{ligações}} + \sum U_{\text{ângulos}} + \sum U_{\text{diedros}} + \sum U_{\text{interações não-ligantes}}}$$

$$\boxed{U_{\text{pares}} = \sum_{\text{ligação}} k_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{ângulo}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{diedro}} \left[ V_0 + \sum_{n=1}^3 V_n \cos(n\phi + \psi_n) \right] + \sum_i \sum_{j \neq i} \left[ 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + f \frac{q_i q_j}{\epsilon_r r_{ij}} \right]}$$

Equação 4

Nas simulações de dinâmica molecular, as ligações químicas e ângulos são geralmente tratados como osciladores harmônicos. Nesse caso, o potencial aumenta de forma quadrática conforme ocorre o deslocamento da distância  $r$  ou do ângulo de ligação  $\theta$  em relação aos valores de equilíbrio  $r_0$  e  $\theta_0$ . Esse aumento é proporcional às constantes de força  $k_b$  e  $k_\theta$ , que são características de cada ligação química e ângulo da molécula. Embora existam outros modelos, como o modelo de Morse, o modelo de osciladores harmônicos é o mais comum e será utilizado nas simulações apresentadas.

O terceiro termo refere-se à energia relacionada à torção dos ângulos de diedro em moléculas flexíveis. Nesse caso, a energia é representada por uma série de Fourier com três termos, em que as amplitudes  $V_n$  e as fases  $\psi_n$  são ajustadas para reproduzir o perfil de energia potencial obtido em cálculos de Química Quântica, quando o ângulo diedro  $f$  é variado.

O último termo abrange as interações não-ligantes e é dividido em duas partes. A primeira corresponde às interações de van der Waals, representadas por um potencial de Lennard-Jones 6-12. Nesse caso,  $\epsilon_{ij}$  representa a energia mínima entre o par de partículas  $i$  e  $j$ , e  $\sigma_{ij}$  representa a distância abaixo da qual a interação entre  $i$  e  $j$  deixa de ser atrativa e passa a ser repulsiva. Essa relação é ilustrada na figura abaixo, que mostra a energia de van der Waals em função da distância entre as partículas para diferentes valores de  $\sigma$  e  $\epsilon$ .<sup>19</sup>

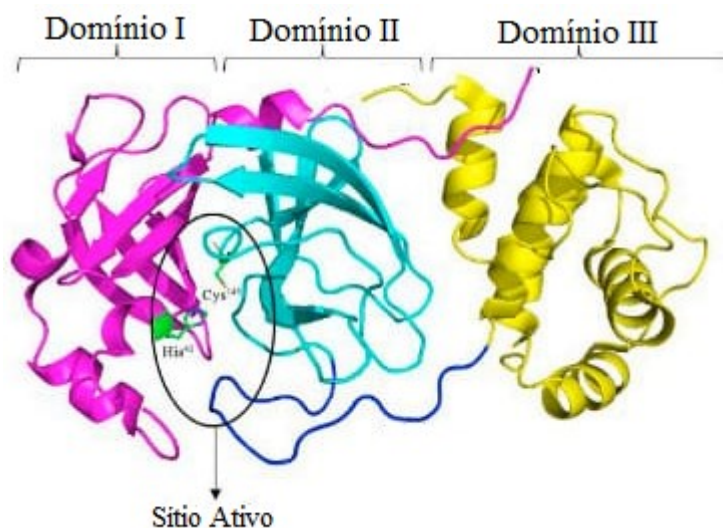


## 2.3 Sítio Ativo

Para a preparação dos ligantes para docking, foi feito um estudo para analisar o sítio ativo da proteína da SARS-CoV-2. Um sítio ativo é uma região específica de uma proteína que é responsável pela sua atividade bioquímica. Essa região é geralmente formada por um conjunto de aminoácidos que possuem uma conformação tridimensional única, capaz de interagir com moléculas específicas e catalisar reações químicas. De acordo com Fersht (1985), "o sítio ativo de uma enzima é um microambiente altamente organizado, onde a molécula do substrato é orientada de forma adequada para reagir quimicamente"<sup>20</sup>. Além disso, o autor destaca que o sítio ativo é também responsável pela especificidade da enzima, ou seja, a capacidade de reconhecer e se ligar apenas a determinados substratos.

A Figura 5 representa o sítio ativo da proteína da SARS-CoV-2, onde vários medicamentos já testados ocuparam esse sítio ativo com afinidade de ligação considerável <sup>21</sup>. Nesse mesmo estudo, a estrutura cristalográfica de raios-X do Mpro do SARS-CoV-2 (ID PDB: 6Y2F), recentemente elucidada que mostrou ser um inibidor potente no sítio ativo da enzima com uma cetoamida, foi examinada com vários medicamentos antivirais aprovados pela FDA para simular as interações do Mpro com a cetoamida e, assim, bloquear o bolso ativo.

Figura 6: Características estruturais do monômero da principal protease do SARS-CoV-2 e seu sítio ativo (Adaptado de Kumar Y, et al. 2020).



A protease principal do SARS-CoV-2 é composta por três regiões distintas. A região

ativa da proteína é encontrada onde o domínio I e o domínio II se encontram, formando um diad característico de Cys-His. O domínio II e o domínio III são unidos por uma conexão que é crucial para a formação de um dímero da proteína.

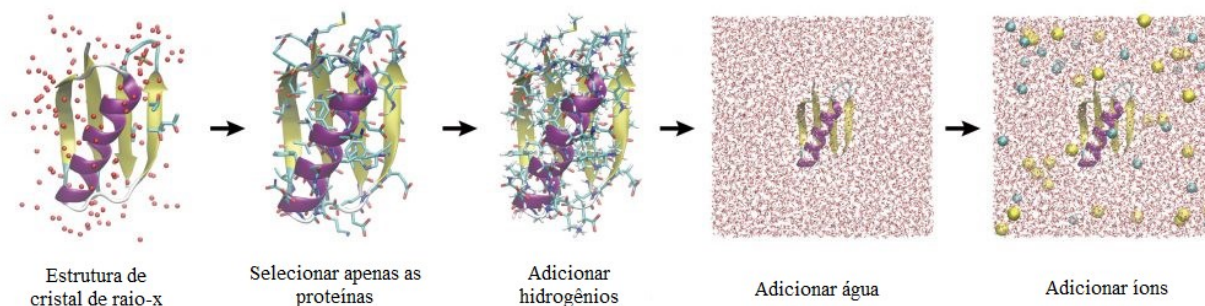
## 2.4 Dinâmica Molecular

Simulações computacionais atuam como uma ponte entre a estrutura microscópica da matéria e a macroscópica, assim como a teoria e o experimento. As propriedades termodinâmicas observáveis podem ser descritas pelo formalismo da mecânica estatística junto com o potencial de interação do sistema, que pode ser obtido a partir da mecânica quântica. Porém, a solução analítica da função de partição só pode ser obtida para um número limitado de sistemas e modelos simplificados, como sólidos e gases ideais. O CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) é um campo de força amplamente utilizado na simulação computacional de biomoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. É baseado em uma descrição de forças de tipo aditivo, na qual os parâmetros de interação entre átomos próximos são determinados empiricamente e implementados em equações matemáticas que descrevem a energia potencial do sistema<sup>22</sup>.

Para garantir a consistência energética de todos os sistemas, foram simulados utilizando o campo de força CHARMM27 no programa NAMD 2.9. Uma etapa de minimização foi realizada, com as configurações de etapa de tempo de 2 fs, distância de corte de 12Å e formalismo de malha de partículas de Ewald (PME). A temperatura foi aumentada gradualmente de 0 a 300 K em incrementos de 1 K sob o conjunto NVT, controlada pelo formalismo de Langevin. Um processo de equilíbrio de 200 ps foi simulado antes de produzir as trajetórias MD finais de 50 ns. Para solvatar todas as moléculas de ligantes, foi adicionada uma coluna de água (20 Å) acima da superfície. As energias VdW e eletrostática foram calculadas usando o software Visual Molecular Dynamics (VMD)<sup>23</sup>.

Para modelar o sistema, uma caixa foi preenchida com um modelo de solvente de água, e íons foram adicionados para neutralizar o sistema. Em seguida, o sistema foi minimizado com cerca de 10.000 passos do algoritmo steepest decent. O solvente foi equilibrado por uma simulação de dinâmica molecular, com átomos não-hidrogenoides fixados.

Figura 7: Etapas da simulação da dinâmica molecular (Adaptado de <https://www.r-ccs.riken.jp/>, Acesso em 17/05/2023)



Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) é um código de dinâmica molecular paralelo utilizado em simulação de alta performance de grandes sistemas biomoleculares tais como proteínas e ácidos nucleicos. As forças não-ligadas requerem o cálculo de interação emparelhadas (pairwise) entre átomos. O raio de corte, RC, é usado na maior parte dos métodos comuns. Interações não-ligadas entre átomos além da distância RC não são calculadas ou são calculadas com menos frequência<sup>24</sup>

As cargas de Mulliken foram atribuídas usando o software VMD 1.9.2<sup>25</sup> Da mesma forma, as cargas de todos os ligantes Zanamivir, Baloxavir e Oseltamivir foram obtidas e atribuídas a todos os átomos usando o programa XTB<sup>26</sup>.

## 2.5 Ligações de Hidrogênio

A ligação de hidrogênio ocorre quando um átomo com um hidrogênio ligado a ele (o doador, D) se conecta a outro átomo (o receptor, A), desde que a distância entre D e A seja menor que 3,0 angstroms e o ângulo D-H-A seja menor que 20 graus. O software VMD<sup>27</sup> permite que seja usado o plugin Hbounds, na qual permite selecionar até dois grupos de átomos (que não devem se sobrepor) e escolher os quadros de tempo para análise. As seleções podem ser atualizadas a cada quadro, mas isso pode afetar a velocidade. O número de ligações de hidrogênio pode ser plotado no VMD ou salvo em um arquivo (hbonds.dat).

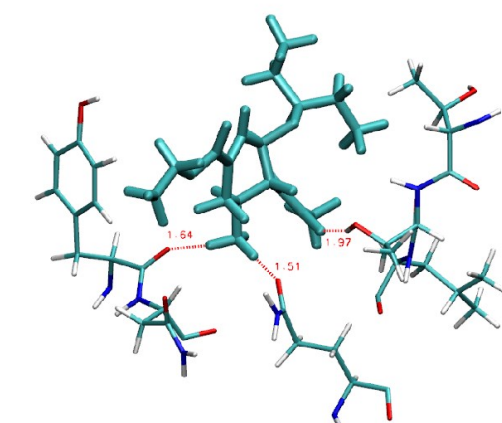
Esse arquivo apresenta a quantidade de ligações de hidrogênio por frame calculado em relação ao ligante estudado. A quantidade de ligações de hidrogênio são apresentadas na Tabela 1:

Tabela 1: Quantidade de ligações de hidrogênio por ligante

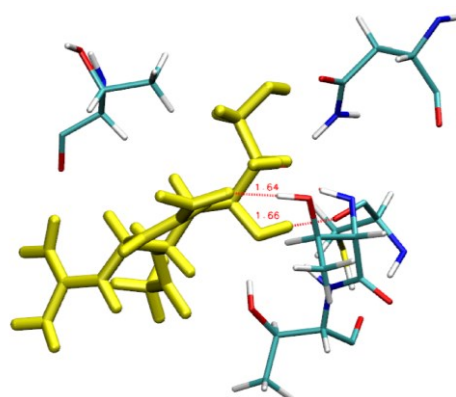
Ligante	Ligações de Hidrogênio
Baloxavir	3
Oseltamivir	3
Zanamivir	2

Com essa análise de ligações de hidrogênio, cada frame de trajetória com a melhor contagem de ligação de hidrogênio foi selecionada para o cálculo de dinâmica molecular (Figura 7).

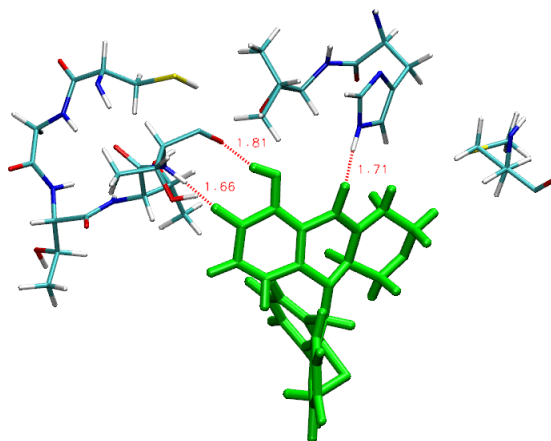
Figura 8: Melhores frames de trajetória para ligações de hidrogênio em cada ligante.



Oseltamivir



Zanamivir



Baloxavir

Fonte: O autor

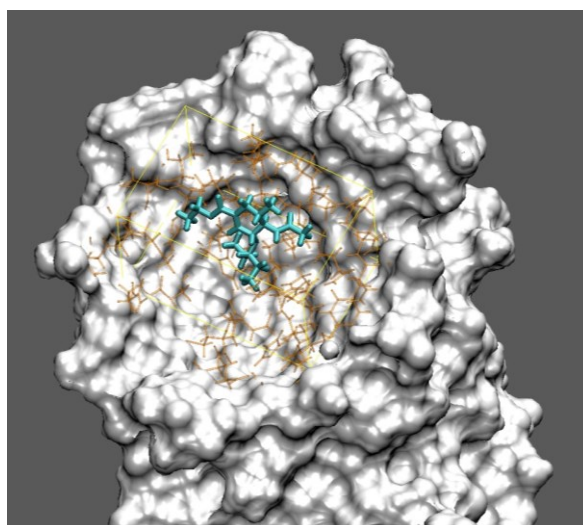
### 3 Resultados e Discussões

Foram analisados 3 fármacos antivirais com a proteína do Covid-19, esses procedimentos foram realizados através do DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br>), evidenciados nas tabela 2, 3, 4 e 5.

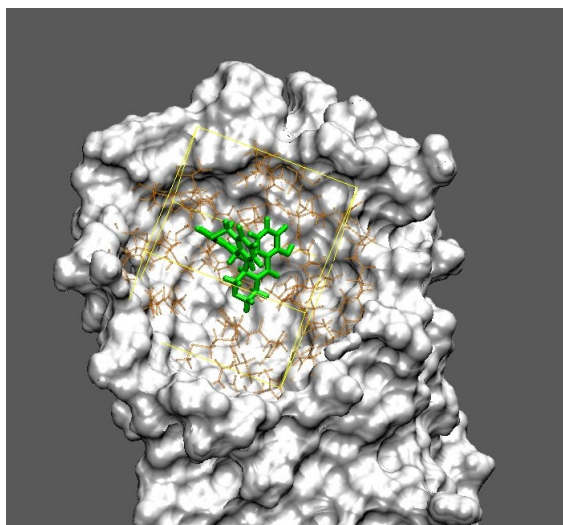
Figura 9: A configuração do bind docking feita pelo DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br>) utilizou da seguinte configuração de grade:

```
center x = 11
center y = 10
center z = 18
total size x = 20
total size y = 20
total size z = 20
discretization = 0.25
```

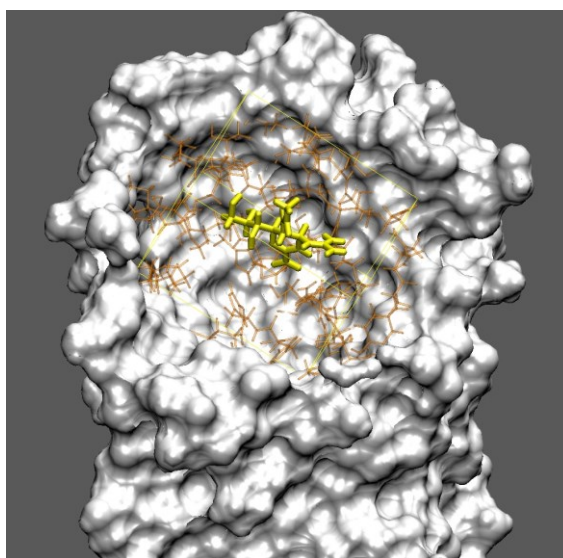
Figura 10: Resultado da box calculada pelo DockThor para a análise do docking do Oseltamivir, Baloxavir e Zanamivir respectivamente:



Oseltamivir



Baloxavir



Zanamivir

Fonte: O autor

Onde para os 3 ligantes, o bind docking utilizou-se das mesmas configurações de grade. Com isso, podemos concluir que o sítio ativo estudado é realmente o local onde as interações e ligações de hidrogênio ocorrem entre os ligantes e os aminoácidos.

O output do DockThor também retorna o arquivo bestranking.csv onde nele estão as execuções que mais performaram, ou seja, que é o mais recomendado para estudos. Ao todo,

foram realizadas 24 execuções para cada ligante, onde para cada fármaco, a execução 1 é a que foi analisada e estudada nesta pesquisa.

Tabela 2: Análise do docking molecular para o ligante Baloxavir

Execuções	Afinidade (kcal/mol)	Energia Total (kcal/mol)	Energia de vdW (kcal/mol)	Energia Eletrônica (kcal/mol)
<b>1</b>	<b>-7.798</b>	<b>64.387</b>	<b>-14.772</b>	<b>-14.857</b>
2	-8.227	69.384	-16.671	-7.785
3	-8.202	69.925	-20.902	-2.619

Tabela 3: Análise do docking molecular para o ligante Oseltamivir

Execuções	Afinidade (kcal/mol)	Energia Total (kcal/mol)	Energia de vdW (kcal/mol)	Energia Eletrônica (kcal/mol)
<b>1</b>	<b>-7.667</b>	<b>15.473</b>	<b>-16.680</b>	<b>-7.135</b>
2	-7.036	16.729	-11.273	-11.147
3	-7.551	16.752	-18.570	-4.485

Tabela 4: Análise do docking molecular para o ligante Zanamivir

Execuções	Afinidade (kcal/mol)	Energia Total (kcal/mol)	Energia de vdW (kcal/mol)	Energia Eletrônica (kcal/mol)
<b>1</b>	<b>-6.676</b>	<b>-38.076</b>	<b>9.224</b>	<b>-43.953</b>
2	-6.929	-37.733	-14.097	-20.210
3	-6.438	-35.030	-9.425	-24.468

Tabela 5: Parâmetros de afinidade molecular dos fármacos com a proteína do Covid-19 (6Y2F)



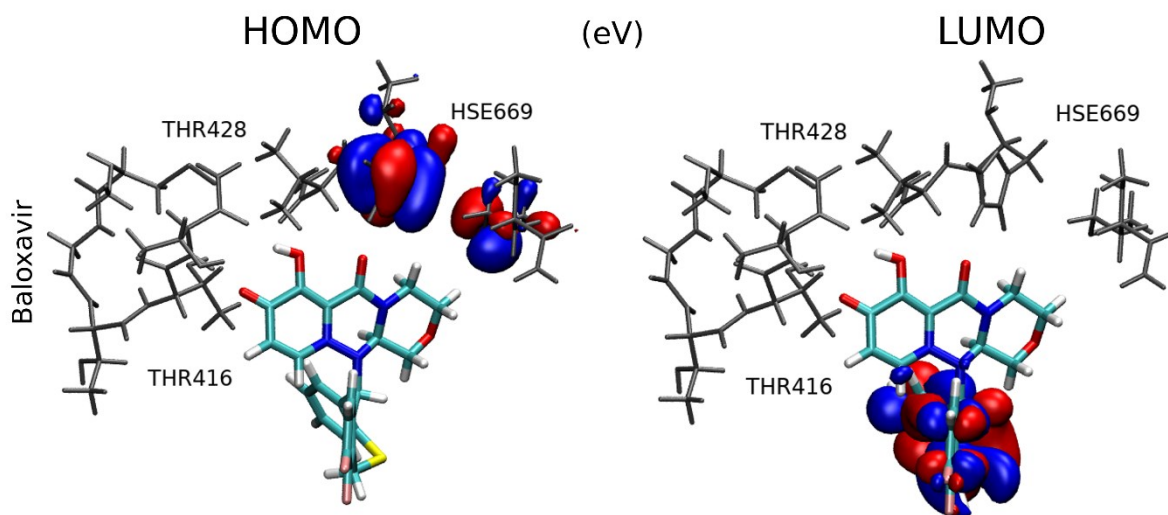
Ligantes	$\Delta G_{bind}$ (kcal/mol)	Ki (uM)	Aminoácidos que interagem com o ligante
Baloxavir	-7.798	2.08	Ser139; Ser144; Glu166; Met165; Gln189; Thr45. Leu141; Ser144; Ser147; Asn28; Gln19; Met17;
Oseltamivir	-7.667	2.59	Glu14; Gly120; Asn119; Cys117; Leu115; Tyr118; Ala116.
Zanamivir	-6.676	1.36	Thr45; Cys44; Thr25; Gly143; Asn142.

A teoria dos orbitais moleculares que envolve a análise dos orbitais HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital - Orbital Molecular mais Elevado Ocupado) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital - Orbital Molecular mais Baixo Não Ocupado) é uma das teorias mais úteis para explicar a estabilidade química de uma molécula. A energia dos orbitais HOMO e LUMO dos ligantes e complexos fornecem informações importantes sobre a distribuição de energia e o comportamento energético desses compostos. A magnitude negativa da energia HOMO e LUMO estabelece a estabilidade dos compostos. A diferença entre as energias HOMO e LUMO, conhecida como "lacuna de energia", é um indicador da reatividade química e da estabilidade cinética de uma molécula. Uma molécula com uma grande lacuna HOMO-LUMO é descrita como "dura", pequena e pouco polarizável. Já os sistemas "macios" possuem uma lacuna HOMO-LUMO pequena, alta polarizabilidade e reatividade. Uma grande lacuna HOMO-LUMO indica alta estabilidade molecular e aromaticidade, com baixa reatividade em reações químicas, enquanto uma pequena lacuna HOMO-LUMO está relacionada com antiaromaticidade. As energias HOMO e LUMO representam, respectivamente, a capacidade de doar e receber um elétron. Uma alta energia HOMO corresponde à molécula mais reativa em reações com eletrófilos, enquanto uma baixa energia LUMO indica uma molécula mais reativa em reações com nucleófilos.<sup>28</sup>

A ilustração dos HOMO, LUMO, HOMO+1 e LUMO-1 estão na Figura 8. A fase positiva

e negativa é representada em vermelho e azul respectivamente.

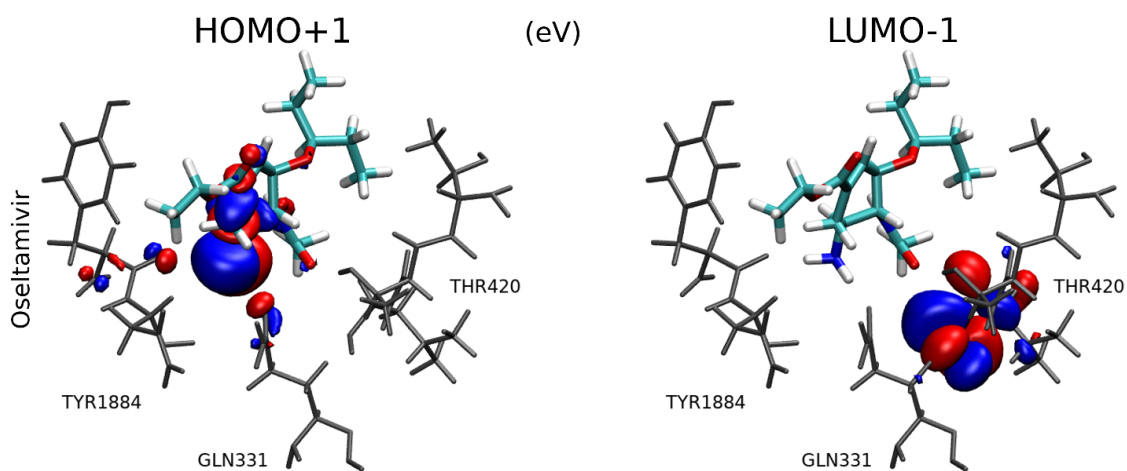
Figura 11: Interação HOMO e LUMO do baloxavir com a proteína da Covid-19.



Fonte: O autor

De acordo com a Tabela 2, a afinidade molecular do Baloxavir com a proteína do novo coronavírus apresentou o valor de  $-7.798$  kcal/mol e constante de inibição de  $2.08$   $\mu\text{M}$ , interagindo com os aminoácidos Ser139, Ser144, Glu166, Met165, Gln189 e Thr45.

Figura 12: Interação HOMO e LUMO do oseltamivir com a proteína da Covid-19.

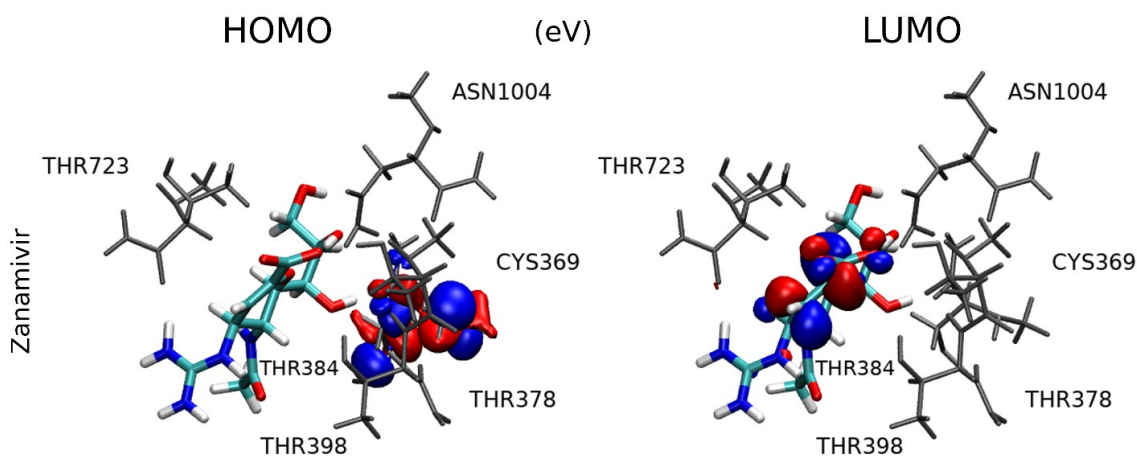


Fonte: O autor

De acordo com a Tabela 3, o Oseltamivir apresentou o valor de  $-7.667$  kcal/mol e

constante de inibição de 2.59  $\mu\text{M}$ , interagindo com os aminoácidos Leu141, Ser144, Ser147, Asn28, Gln19, Met17, Glu14, Gly120, Asn119, Cys117, Leu115, Tyr118 e Ala116.

Figura 13: Interação HOMO e LUMO do zanamivir com a proteína da Covid-19.



Fonte: O autor

De acordo com a Tabela 4, a interação do Zanamivir com a proteína do novo coronavírus apresentou o valor de  $-6.676$  kcal/mol e constante de inibição de  $1.36$   $\mu\text{M}$ , interagindo com os aminoácidos Thr45, Cys44, Thr25, Gly143 e Asn142.

Para o Baloxavir, temos um GAP de  $1.3167$  eV. O Oseltamivir apresenta um GAP de  $1.8411$  eV. Por fim, o Zanamivir tem um GAP de  $0.66178$  eV.

Esta diferença de energia entre HOMO-LUMO indica a altas energias de excitação, ou seja, é necessária uma menor energia de transição para que o elétron possa realizar uma transição eletrônica, o que é possível concluir que há uma interação favorável entre fármaco e proteína.

Foram calculadas também via Visual Molecular Dynamics (VMD), as distâncias das ligações de hidrogênio (Å).

Para o Baloxavir, tivemos 3 ligações de hidrogênio com distâncias abaixo de  $2.5$  Å. O fármaco Oseltamivir apresentou também 3 ligações de hidrogênio com distâncias abaixo de  $2.5$  Å. Por fim, o fármaco Zanamivir apresentou 2 ligações de hidrogênio com o mesmo parâmetro de distância utilizado nos outros ligantes (Figura 11).

Esse estudo mostrou que a região ativa da proteína encontrada onde o domínio I e o domínio II se encontram (Figura 5) é o melhor alvo de drogas entre as demais regiões. O ligante Oseltamivir mostra fortes interações de ligação com os aminoácidos circundantes na região de  $2.5$  Å em

diferentes subsítios com Leu141;Ser144; Ser147; Asn28; Gln19; Met17; Glu14; Gly120; Asn119; Cys117; Leu115; Tyr118; Ala116. Essa interação proteína-ligante revela uma forte inibição da protease do vírus.<sup>29</sup>

O GAP de energia mais baixo calculado para a transição HOMO-LUMO foi atribuído ao zanamivir. Em termos de transferência de carga, um pequeno tamanho de lacuna de energia resulta em um complexo forte e estável. No caso do Oseltamivir e do Baloxavir, as lacunas de energia foram maiores do que no zanamivir, resultando em complexos instáveis.

A elevada afinidade de ligação é indicada pelo baixo valor da constante de inibição. Entre os ligantes examinados, o Zanamivir apresentou o menor  $K_i$  registrado na Tabela 5, com um valor de 1,36  $\mu\text{M}$ , o que indica a formação de um complexo altamente estável com a estrutura da protease principal do Sars-CoV-2 e, portanto, uma afinidade de ligação mais forte do que os demais.

Embora os resultados preliminares indiquem que o Zanamivir é o ligante mais eficiente, é inconclusivo dizer que tais drogas podem inibir a atividade da proteína Covid-19. A análise *in vitro* precisa ser realizada para garantir tal resultado.

## 4 Conclusão

A pandemia ocasionada pelo novo coronavírus (COVID-19) afetou o mundo todo, consequentemente, trouxe efeitos gravíssimos em todos os países e para a população. O rápido aumento do número de pacientes infectados em todo o mundo fez a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar um estado de emergência de saúde global para coordenar os esforços científicos e médicos e desenvolver rapidamente uma cura para os pacientes. Apesar de usarem alguns agentes antivirais específicos aprovados, os mesmos, não produzem uma cura completa. Pensando nisso, a busca por um fármaco que contribua positivamente para ajudar no combate do novo coronavírus está sendo alvo de muitas pesquisas. Assim, o trabalho trouxe a testes a interação molecular entre fármacos diuréticos e as proteínas selecionadas no banco de dados do novo coronavírus. A partir dos resultados obtidos diante deste trabalho conclui-se que os fármacos Baloxavir, Oseltamivir e Zanamivir apresentaram maiores afinidades com as proteínas selecionadas, apresentando valores de energia de ligação abaixo de  $-8.0$  kcal/mol. Portanto, o reposicionamento ou a substituição de grupos funcionais pré-selecionados dos fármacos analisados pode ser uma alternativa para o tratamento da Covid-19, pois a afinidade molecular dos fármacos com as proteínas do vírus obteve resultados satisfatórios. Esse trabalho pode ser considerado um alicerce para novos estudos com esses fármacos para a inibição do vírus da Covid-19.

## 5 Referências

- <sup>1</sup> HAYDEN, Frederick G. *et al*, Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents, **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 10, p. 913–923, 2018.
- <sup>2</sup> CORRÊA, Marilena Cordeiro Dias Villela; VILARINHO, Luiz; BARROSO, Wanise Borges Gouvea, Controvérsias em torno do uso experimental da cloroquina / hidroxiclороquina contra a Covid-19: “no magic bullet”, **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 30, n. 2, p. e300217, 2020.
- <sup>3</sup> PERSON, Osmar Clayton *et al*, **Intervenção com ivermectina para COVID-19 (SARS-Cov 2): sinopse baseada em evidências**, [s.l.: s.n.], 2021.
- <sup>4</sup> CORRÊA; VILARINHO; BARROSO, Controvérsias em torno do uso experimental da cloroquina / hidroxiclороquina contra a Covid-19.
- <sup>5</sup> OMOTO, Shinya *et al*, Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil, **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9633, 2018.
- <sup>6</sup> WHO, Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) - Antiviral Resistance. 2019.
- <sup>7</sup> BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Influenza. Brasília, DF, 2020.
- <sup>8</sup> THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP, Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19, **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693–704, 2021.
- <sup>9</sup> DOLL, M. K *et al*, Safety and effectiveness of neuraminidase inhibitors for influenza treatment, prophylaxis, and outbreak control: a systematic review of systematic reviews and/or meta-analyses, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 2990–3007, 2017.
- <sup>10</sup> MACCONNACHIE, Zanamivir (Relenza®)-A new treatment for influenza, 1999.
- <sup>11</sup> PDB-Protein Data Bank. Disponível em: <https://www.rcsb.org>.
- <sup>12</sup> MORRIS, Garrett M *et al*, Updated for version 4.2.6.
- <sup>13</sup> SANTOS, Karina B. *et al*, Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein–Peptide Data Set, **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 667–683, 2020.
- <sup>14</sup> GUEDES, Isabella A. *et al*, New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery, **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3198, 2021.
- <sup>15</sup> DE MAGALHÃES, Camila Silva *et al*, A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands, **Information Sciences**, v. 289, p. 206–224, 2014.
- <sup>16</sup> MORRIS *et al*, Updated for version 4.2.6.
- <sup>17</sup> MORRIS, Garrett M. *et al*, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
- <sup>18</sup> MACKERELL, Alexander D.; BANAVALI, Nilesh; FOLOPPE, Nicolas, Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids, **Biopolymers**, v. 56, n. 4, p. 257–265, 2000.
- <sup>19</sup> van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A. R., Apol, E., Meulenhoff, P. J., Tieleman, D. P., Sijbers, A. L. T. M., Feenstra, K. A., van Drunen, R., Berendsen, H. J. C., Gromacs User Manual version 4.0, disponível na página [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org), 2005.
- <sup>20</sup> HERRIES, Dg, Enzyme Structure and Mechanism (Second Edition), **Biochemical Education**, v. 13, n. 3, p. 146, 1985.
- <sup>21</sup> KUMAR, Yogesh; SINGH, Harvijay; PATEL, Chirag N., 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**, v. 13, n. 9, p. 1210–1223, 2020.
- <sup>22</sup> MACKERELL; BANAVALI; FOLOPPE, Development and current status of the CHARMM

---

force field for nucleic acids.

<sup>23</sup> KALÉ, L. V. *et al*, NAMD: A case study in multilingual parallel programming, *in*: LI, Zhiyuan *et al* (Orgs.), **Languages and Compilers for Parallel Computing**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, v. 1366, p. 367–381.

<sup>24</sup> KALÉ, L. V. *et al*, NAMD: A case study in multilingual parallel programming, *in*: LI, Zhiyuan *et al* (Orgs.), **Languages and Compilers for Parallel Computing**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998, v. 1366, p. 367–381.

<sup>25</sup> DE MAGALHÃES *et al*, A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands.

<sup>26</sup> **Molecular Dynamics Simulations — xtb doc 2023 documentation**, disponível em:

<<https://xtb-docs.readthedocs.io/en/latest/md.html>>. acesso em: 9 jul. 2023.

<sup>27</sup> HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus, VMD: Visual molecular dynamics, **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1996.

<sup>28</sup> CHOUDHARY, VineetKumar *et al*, DFT calculations on molecular structures, HOMO–LUMO study, reactivity descriptors and spectral analyses of newly synthesized diorganotin(IV) 2-chloridophenylacetohydroxamate complexes, **Journal of Computational Chemistry**, v. 40, n. 27, p. 2354–2363, 2019.

<sup>29</sup> BIEMBENGUT, Ísis Venturi; DE SOUZA, Tatiana De Arruda Campos Brasil, Coagulation modifiers targeting SARS-CoV-2 main protease Mpro for COVID-19 treatment: an in silico approach, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200179, 2020.