

## Estudo *In Silico* do Nilotinibe como Possível Inibidor da Protease Principal M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2.

*In Silico* Study of Nilotinib as a Potencial Inhibitor of the Main Protease M<sup>pro</sup> of SARS-CoV-2.

Estudio *In Silico* del Nilotinib como Posible Inhibidor de la Proteasa Principal M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2.

Marcus Vinícius Hungaro Faria<sup>1,2</sup>, Raphael Salles Ferreira Silva<sup>2</sup>, Carlos Maurício Rabello Sant'Anna<sup>3</sup> e Luciano T. Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MolMod-CS, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, CEP 24020-141, Niterói-RJ-Brasil.

<sup>2</sup> Colégio Militar do Rio de Janeiro, CEP 20550-010, Rio de Janeiro-RJ-Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, UFRJ, Seropédica-RJ-Brasil.

### RESUMO

**Introdução:** A pandemia de COVID-19 destacou a necessidade urgente de identificar novos inibidores da protease M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 para o desenvolvimento de terapias antivirais eficazes. O Nilotinibe surge como um potencial candidato. Inibir a protease M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 é essencial, pois essa enzima é responsável pela clivagem de polipeptídeos virais, necessária para a formação de proteínas maduras e a replicação do vírus. Sem a M<sup>pro</sup>, o vírus não pode se replicar nem se espalhar, tornando a inibição dessa protease uma estratégia chave no desenvolvimento de terapias antivirais (ou anti-SARS).

**Objetivo:** Investigar a eficácia do Nilotinibe como inibidor da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, comparando seus resultados com os do PAXLOVID®, um fármaco já aprovado para uso emergencial.

**Métodos:** A pesquisa combinou técnicas de *Docking* Molecular, análise de perfil ADMET e Simulações de Dinâmica Molecular.

**Resultados:** O Nilotinibe apresentou um perfil de interação molecular semelhante ao do PAXLOVID®, com potencial para inibir a M<sup>pro</sup>. No entanto, sua maior flexibilidade estrutural pode influenciar a estabilidade e afinidade no sítio ativo. Em termos de toxicidade, o Nilotinibe apresenta riscos elevados, incluindo hepatotoxicidade, neurotoxicidade, carcinogenicidade e imunotoxicidade, enquanto o PAXLOVID® é neurotóxico. Além disso, o Nilotinibe possui maior potencial de interações medicamentosas devido à inibição de múltiplas enzimas do citocromo P450. Apesar dessas diferenças, ele pode ser uma alternativa viável, especialmente em casos de resistência ao PAXLOVID®.

**Conclusão:** Os achados indicam que o Nilotinibe possui características promissoras como candidato inibidor da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, abrindo caminho para novas abordagens terapêuticas contra a COVID-19. O estudo sugere que o Nilotinibe pode complementar os tratamentos atuais, contribuindo para a diversificação das opções terapêuticas disponíveis.

**Palavras-chave:** Nilotinibe; M<sup>pro</sup>; SARS-CoV-2; Dinâmica Molecular; *Docking* Molecular.

### ABSTRACT

**Introduction:** The COVID-19 pandemic has underscored the urgent need to identify new inhibitors of the SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> protease for developing effective antiviral therapies. Nilotinib has emerged as a potential candidate. Inhibiting the M<sup>pro</sup> protease of SARS-CoV-2 is essential, as this enzyme is responsible for cleaving viral polypeptides, which is necessary for the formation of mature proteins and viral replication. Without M<sup>pro</sup>, the virus cannot replicate or spread, making the inhibition of this protease a key strategy in the development of antiviral (or anti-SARS) therapies.

**Objective:** To evaluate the effectiveness of Nilotinib as an inhibitor of the SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>,

**Correspondência:**  
Marcus Vinícius  
Hungaro Faria  
Universidade Federal  
Fluminense, Niterói, RJ,  
Brasil.  
Email:  
marcus.hungaro@gmail  
l.com

comparing its results with those of PAXLOVID®, a drug already approved for emergency use.

**Methods:** The study utilized techniques including Molecular Docking, ADMET profile analysis, and Molecular Dynamics Simulations.

**Results:** Nilotinib exhibited a molecular interaction profile similar to that of PAXLOVID®, with potential to inhibit M<sup>pro</sup>. However, its greater structural flexibility may influence stability and affinity at the active site. In

terms of toxicity, Nilotinib presents higher risks, including hepatotoxicity, neurotoxicity, carcinogenicity, and immunotoxicity, whereas PAXLOVID® is only neurotoxic. Additionally, Nilotinib has a greater potential for drug interactions due to the inhibition of multiple cytochrome P450 enzymes. Despite these differences, it

may be a viable alternative, especially in cases resistance to PAXLOVID®.

**Conclusion:** The findings indicate that Nilotinib has promising characteristics as a SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup> candidate inhibitor, paving the way for new therapeutic approaches against COVID-19. The study suggests that Nilotinib could complement existing treatments, offering more diverse therapeutic options.

**Keywords:** Nilotinib; M<sup>pro</sup>; SARS-CoV-2; Molecular Dynamics; Molecular Docking.

## RESUMEN

**Introducción:** La pandemia de COVID-19 ha resaltado la necesidad urgente de identificar nuevos inhibidores de la proteasa M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2 para desarrollar terapias antivirales efectivas. El Nilotinib ha surgido como un posible candidato. Inhibir la proteasa M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2 es esencial, ya que esta enzima es responsable de la escisión de polipéptidos virales, necesaria para la formación de proteínas maduras y la replicación del virus. Sin la M<sup>pro</sup>, el virus no puede replicarse ni propagarse, lo que convierte la inhibición de esta proteasa en una estrategia clave para el desarrollo de terapias antivirales (o anti-SARS).

**Objetivo:** Evaluar la eficacia del Nilotinib como inhibidor de la M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2, comparando sus resultados con los de PAXLOVID®, un fármaco ya aprobado para uso de emergencia.

**Métodos:** El estudio utilizó técnicas como el Docking Molecular, análisis del perfil ADMET y Simulaciones de Dinámica Molecular.

**Resultados:** Nilotinib mostró un perfil de interacción molecular similar al de PAXLOVID®, con potencial para inhibir la M<sup>pro</sup>. Sin embargo, su mayor flexibilidad estructural puede influir en la estabilidad y afinidad en el sitio activo. En términos de toxicidad, Nilotinib presenta mayores riesgos, incluyendo hepatotoxicidad, neurotoxicidad, carcinogenicidad e inmunotoxicidad, mientras que PAXLOVID® es solo neurotóxico. Además, Nilotinib tiene un mayor potencial de interacciones farmacológicas debido a la inhibición de múltiples enzimas del citocromo P450. A pesar de estas diferencias, podría ser una alternativa viable, especialmente en casos de resistencia a PAXLOVID®.

**Conclusión:** Los hallazgos indican que el Nilotinib posee características prometedoras como inhibidor de la M<sup>pro</sup> del SARS-CoV-2, allanando el camino para nuevos enfoques terapéuticos contra la COVID-19. El estudio sugiere que el Nilotinib podría complementar los tratamientos actuales, ofreciendo una mayor diversidad de opciones terapéuticas.

**Palabras clave:** Nilotinib; M<sup>pro</sup>; SARS-CoV-2; Dinámica Molecular; Docking Molecular.

## INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, o mundo enfrentou várias epidemias de vírus da família dos coronavírus, como a SARS em 2002, a MERS em 2012 e, mais recentemente, a COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, que surgiu em Wuhan, China, em 2019 (Li *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). A pandemia de COVID-19 apresentou rápida disseminação global, resultando em mais de 600 milhões de infecções e 7 milhões de mortes até 2025, sendo especialmente perigosa para grupos vulneráveis e causando impactos profundos na saúde pública e na economia mundial (OMS, 2025).

Essa aceleração na propagação do SARS-CoV-2, assim como de outras epidemias de coronavírus, destaca a importância de se compreender melhor a família dos coronavírus (*Coronaviridae*). Os coronavírus são vírus de RNA de fita positiva, envelopados, com genoma que pode variar de 26 a 32 quilobases (Chen *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2020). Estes vírus são caracterizados por uma estrutura esférica ou pleomórfica e possuem projeções em forma de coroa (daí o nome "coronavírus") em sua superfície, que são formadas pela proteína *Spike* (S)<sup>1</sup>. A proteína *Spike* é determinante para a infectividade do vírus, pois é responsável pela interação do coronavírus com o receptor celular humano, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), permitindo sua entrada nas células hospedeiras (Wang *et al.*, 2020). Além disso, os coronavírus possuem uma membrana lipídica envolvente, que contém proteínas adicionais como a E (Envelope) e M (Membrana), fundamentais para a estabilidade e infectividade viral. A diversidade e adaptabilidade estrutural dos coronavírus, incluindo sua capacidade de mutação, tornam o estudo dessas proteínas indispensável para o desenvolvimento de terapias antivirais e vacinas, como a dirigida contra a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 (Kandwl *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2023).

Em face da constante evolução viral, como evidenciado pela emergência de variantes como a XEC<sup>2</sup>, ressalta a necessidade de vigilância contínua. A variante XEC, uma sublinhagem das variantes KP3.3 e KS1.1 da Omicron, possui mutações importantes na proteína *Spike*, como T22N, F59S, F456L, Q493E e V1104L, que facilitam a entrada viral nas células do hospedeiro (Rizzo-Valente *et al.*, 2024). Em 24 de setembro de 2024, a XEC foi classificada como "Variante Sob Monitoramento", sendo detectada em 29 países e 24 estados dos EUA, o que destaca a urgência de estratégias de controle (Rizzo-Valente *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o estudo da *protease*<sup>3</sup> principal do SARS-CoV-2, conhecida como M<sup>pro</sup> (ou 3CL<sup>pro</sup>, uma cisteína protease semelhante à quimotripsina), é necessário para compreender a bioquímica do vírus e suas interações (Jin *et al.*, 2020). A M<sup>pro</sup> desempenha um papel determinante na maturação viral, processando poliproteínas traduzidas a partir do RNA viral. Possuindo uma díade catalítica (Cys145/His41), a M<sup>pro</sup> cliva seus substratos utilizando essa estrutura. Resíduos localizados no sítio ativo, como Thr25, Thr26, Leu27, Ser46, Met49, Tyr54, Phe140, Leu141, Asn142, Gly143, His163, Met165, Glu166, Leu167, Pro168, Phe185, Asp187, Gln189, Thr190, Ala191 e Gln192, são fundamentais tanto para a ligação do substrato quanto para auxiliar o planejamento de inibidores (Nguyen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Essa enzima é inerente ao ciclo de vida do vírus, catalisando a clivagem de poliproteínas em proteínas funcionais, incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é crítica para a replicação do RNA viral (Freitas *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Naik *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020).

A estrutura cristalina da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, elucidada por Zhang *et al.* (2020), fornece informações primordiais ao desenvolvimento de inibidores da classe das alfa-cetoamidas mais

---

<sup>1</sup> A proteína *Spike* dos coronavírus é comumente referida como "*spike*" em inglês, um termo que significa "pico", mas que na tradução literal para o português deveria ser "espícula". No entanto, "*spike*" é amplamente utilizado na literatura científica em português, devido à sua aceitação internacional. Embora "espícula" seja o termo mais preciso para descrever a forma e função dessa proteína, a terminologia "*spike*" permanece prevalente em muitas publicações científicas e discussões. Para maior clareza e consistência, este artigo adota o termo "proteína *Spike*".

<sup>2</sup> A variante XEC do SARS-CoV-2, identificada em 2023 como uma subvariante da linhagem Omicron, apresenta mutações que podem aumentar a transmissibilidade e afetar a eficácia das vacinas.

<sup>3</sup> *Proteases* são enzimas que degradam proteínas em peptídeos ou aminoácidos, característicos em processos biológicos como digestão e regulação do ciclo celular. Elas são classificadas em diferentes tipos, como serino, cisteína, aspártico e metaloproteases, com base em seus mecanismos de ação.

eficazes contra o vírus. O subsítio<sup>4</sup> S1 é composto pelos aminoácidos Phe140, Leu141, Asn142, His163, Glu166 e His172. Uma pequena parte do subsítio S1 é ainda separada por Asn142 como S1', que é composto por Thr25, Thr26 e Leu27. O subsítio S2 hidrofóbico é composto por His41, Met49, Tyr54, Met165 e Asp187. O subsítio S3 é constituído por Ser144, Cys145, Gly146, Ser147 e Val148. O subsítio de ligação S4 envolve os aminoácidos Met165, Leu167, Phe185, Gln189 e Gln192.

Paralelamente, Koulgi *et al.* (2021) exploraram o reposicionamento de medicamentos visando a M<sup>pro</sup>, destacando-a como um alvo terapêutico promissor para inibir a replicação do SARS-CoV-2 e contribuir para o tratamento da COVID-19. Além de sua função crítica na maturação viral, a M<sup>pro</sup> é altamente conservada entre os coronavírus SARS-CoV e SARS-CoV-2, consolidando-se como um alvo terapêutico primário para o desenvolvimento de novos agentes antivirais (Jin *et al.*, 2020). Sua estrutura cristalográfica revela uma configuração tridimensional complexa, composta por esses três domínios citados acima que otimizam a atividade catalítica (Xue *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016). O sítio ativo, situado entre os domínios I e II, apresenta estruturas antiparalelas da folha  $\beta$ , com o domínio I abrangendo os resíduos 1-101 e o domínio II, os resíduos 102-184. Além disso, cinco  $\alpha$ -hélices estão conectadas paralelamente ao domínio II através de um longo laço (resíduos 185-200), denominado em inglês como "*linker loop*"<sup>5</sup>, no domínio III (resíduos 201-305) (Jin *et al.*, 2020), como ilustrado na Figura 1. A atividade enzimática da M<sup>pro</sup> depende de um dímero formado pelos resíduos Cys145 e His41, que são vitais para a sua função catalítica. Além disso, a dimerização da enzima também envolve o resíduo Glu166, conforme descrito por Nguyen *et al.* (2020).

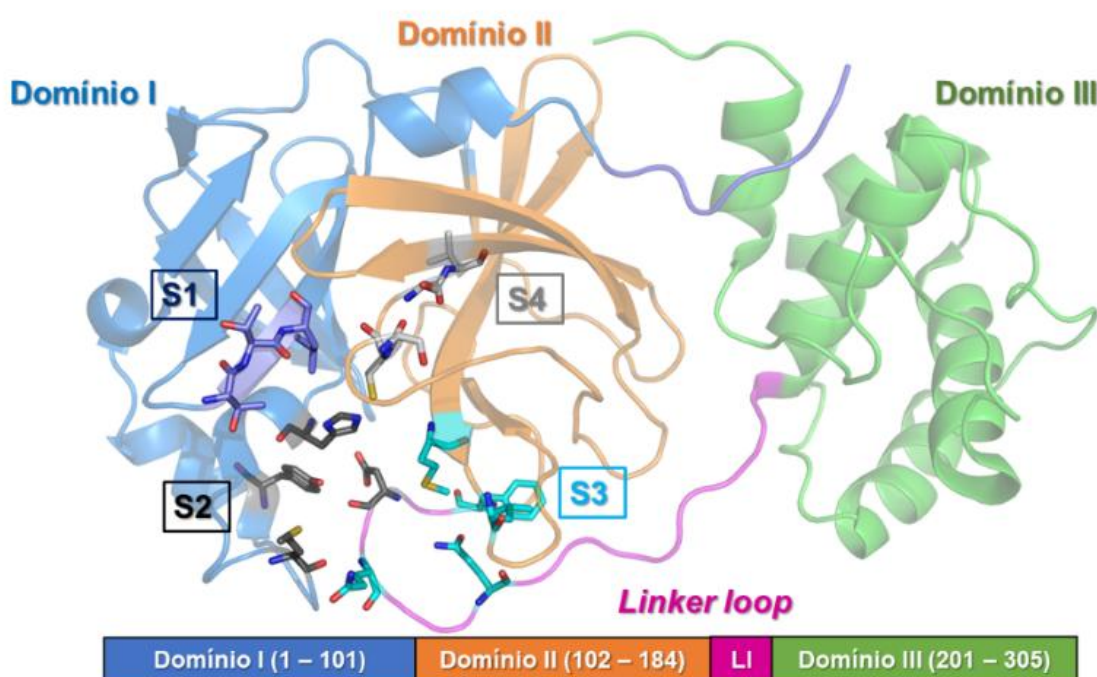


Figura 1: Estrutura tridimensional da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, destacando os principais domínios e os resíduos dos subdomínios S1 (resíduos representados em bastões roxos), S2 (bastões pretos), S3 (bastões cianos) e S4 (bastões cinzas). A figura também mostra a conexão entre os domínios II e III por meio do "*linker loop*", que afeta a flexibilidade estrutural e a atividade catalítica da enzima, sendo importante para sua função na maturação viral.

Estudos anteriores identificaram subunidades na região do sítio ativo da M<sup>pro</sup> que desempenham um papel substancial na especificidade e eficiência da clivagem, destacando seu potencial como um alvo promissor para intervenções farmacológicas (Vardhan & Sahoo, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Além da díade catalítica formada, mencionada acima e constituída pelos resíduos Cys145 e His41, e do

<sup>4</sup> Os termos "*subsítio*" e "*pocket*" são frequentemente usados de forma intercambiável em estudos de *docking* molecular e de interações proteína-ligante. Eles se referem a áreas específicas dentro do sítio ativo de uma proteína onde ocorre o encaixe de ligantes.

<sup>5</sup> O "*linker loop*" é uma região flexível em proteínas que conecta domínios estruturais, fundamental para a função e dinâmica da proteína. Essas regiões podem afetar a atividade enzimática e as interações com ligantes, servindo como alvos potenciais para o *design* de fármacos. A flexibilidade proporcionada pelos *linker loops* permite interações essenciais em processos biológicos, destacando sua importância na modulação de interações proteína-proteína.

papel estrutural do Glu166, também são importantes os resíduos Phe140, His163 e His172. Esses resíduos são característicos para a formação do “pocket”<sup>6</sup> (cavidade ou subsítio) de ligação ao substrato (S1 pocket), que facilita o reconhecimento e o posicionamento dos peptídeos processados pela M<sup>pro</sup>.

Entre as abordagens terapêuticas inovadoras, a FDA<sup>7</sup> concedeu autorização de uso emergencial para o PAXLOVID®<sup>8</sup>, doravante referido como **PAX** (Figura 2), um inibidor oral da M<sup>pro</sup> desenvolvido pela Pfizer. O **PAX** combina Nirmatrelvir (um inibidor de protease viral) e Ritonavir (um inibidor de protease do *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), que potencializa os níveis por aumentar a concentração plasmática do Nirmatrelvir ao inibir seu metabolismo mediado pela CYP3A) (Kincaid *et al.*, 2022). Embora nos refiramos ao tratamento como **PAX**, nosso estudo e cálculos subsequentes focam exclusivamente no Nirmatrelvir, que é o principal componente ativo responsável pela inibição viral. Estudos demonstraram que o **PAX** é eficaz na redução de hospitalizações e mortalidade em pacientes de alto risco com COVID-19 leve a moderada, representando um avanço significativo nas opções terapêuticas (FDA, 2021; Lee *et al.*, 2022).<sup>9</sup>

A caracterização do envelope do substrato da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 é fundamental para prever e evitar a resistência a medicamentos, sendo necessário ao desenvolvimento de terapias eficazes e duradouras (Shaqra *et al.*, 2022). Além disso, a análise de vigilância genética mostrou uma alta conservação sequencial e estrutural da M<sup>pro</sup> antes do uso do inibidor **PAX**, indicando que a M<sup>pro</sup> permanece um alvo viável para intervenções terapêuticas (Lee *et al.*, 2022). No entanto, a variação na eficácia entre diferentes pacientes destaca a necessidade de abordagens de tratamento multifacetadas, que podem incluir combinações de terapias para otimizar os resultados clínicos. Recentemente, investigações sobre a resistência ao **PAX** revelaram desafios que precisam ser abordados para garantir o sucesso contínuo do inibidor no tratamento da COVID-19 (Yaghi *et al.*, 2024).

Neste contexto, a pesquisa propõe investigar o *Nilotinibe*<sup>10</sup>, doravante referido como **NLB**, um inibidor de tirosina quinase (ou cinase) aprovado pela FDA, que se destaca como uma possível alternativa terapêutica. Este medicamento de *segunda geração*<sup>11</sup> tem mostrado desempenho significativa na redução da carga tumoral em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), especialmente aqueles resistentes a outros tratamentos (Breccia & Alimena, 2010). Estudos indicam que o **NLB** possui um perfil de inibição estendido em várias quinases (ou cinases), o que pode aumentar sua eficácia terapêutica (Manley *et al.*, 2010). Além disso, sua absorção e metabolismo são influenciados por transportadores hepáticos, como *OATP-1B1* e *OATP-1B3*<sup>12</sup>, refletindo a

---

<sup>6</sup> O “pocket” de ligação ao substrato, ou “S1 pocket”, é uma cavidade na superfície da protease M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 que permite a interação com substratos peptídicos. Essa região é crítica para o reconhecimento e o posicionamento adequado dos peptídeos que serão clivados pela enzima, influenciando a especificidade e a atividade enzimática da M<sup>pro</sup> (Vardhan & Sahoo, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

<sup>7</sup> A Food and Drug Administration (FDA) dos EUA é responsável pela regulamentação de medicamentos e vacinas.

<sup>8</sup> O PAXLOVID® é um antiviral oral aprovado para uso emergencial no tratamento da COVID-19, composto por Nirmatrelvir e Ritonavir. O nirmatrelvir inibe a protease M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, impedindo a replicação viral, enquanto o ritonavir inibe as enzimas hepáticas, como a CYP3A4, que degradariam o nirmatrelvir. Isso mantém o nirmatrelvir em níveis mais altos no corpo por mais tempo, aumentando sua eficácia antiviral. O PAXLOVID® mostrou-se eficaz na redução da carga viral e na gravidade dos sintomas, sendo uma opção relevante para pacientes em risco de formas graves da doença (FDA, 2021; Mahase, 2021).

<sup>9</sup> Nos Estados Unidos, um tratamento completo de cinco dias com PAXLOVID custa aproximadamente 529 USD (Focosi *et al.*, 2023). Esse valor equivale a um custo de cerca de 21.000 USD por hospitalização evitada, considerando a taxa de efetividade do medicamento. Em comparação, o custo médio de internação hospitalar devido à COVID-19 nos EUA é estimado em 24.826 USD (Shrestha *et al.*, 2021). No entanto, após a ampla introdução das vacinas contra a COVID-19, a eficácia do PAXLOVID na prevenção de hospitalizações diminuiu. A Taxa de Redução Absoluta (ARR) caiu de 5,8% para 1,8%, elevando o Número Necessário para Tratar (NNT) de 19 para 56 pacientes para prevenir uma única hospitalização. Como consequência, o investimento necessário para evitar uma internação hospitalar subiu para aproximadamente 35.000 USD (Arbel *et al.*, 2022). Esses dados destacam a importância de reavaliar continuamente o custo-benefício das terapias antivirais à luz das mudanças no cenário epidemiológico e da disponibilidade de outras estratégias de mitigação da doença.

<sup>10</sup> *Nilotinib* é o nome comercial, sendo o nome IUPAC N-(3-(1-(2-(4-(trifluorometil)fenil)-6-(isopropil)pirimidin-2-il)-1H-pirazol-4-il)-4-metoxifenil) propanamida.

<sup>11</sup> Medicamentos de *segunda geração* referem-se a tratamentos utilizados quando a terapia inicial (ou de primeira linha) não é eficaz ou causa efeitos colaterais intoleráveis. Esses medicamentos são frequentemente empregados em contextos como infecções, câncer e HIV, garantindo alternativas eficazes para o manejo da doença (Breccia & Alimena, 2010; Smith *et al.*, 2023).

<sup>12</sup> *OATP-1B1* (Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1) e *OATP-1B3* (Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3) são transportadores de membrana que desempenham papéis importantes na captação de fármacos e outros compostos endógenos, como bile e hormônios, no fígado. Eles são essenciais para a farmacocinética de muitos medicamentos e têm implicações significativas na funcionalidade terapêutica e na toxicidade dos tratamentos (Zhang *et al.*, 2019).

complexidade de sua farmacocinética (Khurana *et al.*, 2014a; Khurana *et al.*, 2014b). Mais recentemente, o **NLB** foi identificado como um potencial inibidor da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 em um estudo de triagem virtual realizado por De Oliveira *et al.* (2021), que focou no reposicionamento de medicamentos aprovados.

No entanto, seu uso clínico enfrenta desafios devido aos efeitos adversos documentados, incluindo hepatotoxicidade, neurotoxicidade, carcinogenicidade e imunotoxicidade, além de um alto potencial de interações medicamentosas em razão da inibição de múltiplas enzimas do citocromo P450. Estudos recentes conduzida por Banerjee *et al.* (2021) combinaram modelagem molecular e ensaios *in vitro* para avaliar a eficácia do **NLB** contra a M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2. Os resultados indicaram que o fármaco se liga de forma estável ao sítio ativo da protease, demonstrando um potencial significativo para prevenção da replicação viral. Essa conclusão é reforçada por Molavi *et al.* (2021), que utilizaram uma abordagem de reposicionamento de fármacos e identificaram o **NLB** como um inibidor promissor não apenas da M<sup>pro</sup>, mas também da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), o que amplia seu potencial de eficácia antiviral.

Além disso, Novak *et al.* (2022) exploraram novos sítios alostéricos na M<sup>pro</sup>, indicando que o **NLB** pode atuar além do sítio ativo tradicional, o que reduziria a probabilidade de resistência viral. Essa característica pode ser um diferencial importante em relação ao **PAX**, uma vez que o desenvolvimento de mutações na M<sup>pro</sup> pode comprometer a eficácia do tratamento com **NLB**. Por fim, Liu *et al.* (2023) realizaram uma triagem computacional de uma ampla biblioteca de compostos e também identificaram o **NLB** como um candidato viável à inibição do M<sup>pro</sup>, reforçando a consistência dos achados anteriores. Complementando essas análises, Loschwitz *et al.* (2021) conduziram estudos baseados em dinâmica molecular combinados com ensaios *in vitro*, identificando novos inibidores da M<sup>pro</sup> e destacando o **NLB** como um candidato promissor, devido à sua capacidade de se ligar estávelmente com essa protease do SARS-CoV-2.

Diante dessas evidências, a avaliação do **NLB** como alternativa ao **PAX** podem ser justificadas por três fatores principais. Primeiro, a crescente resistência ao **PAX** torna necessário o desenvolvimento de novos inibidores da M<sup>pro</sup>, e a atuação do **NLB** em sítios alostéricos pode conferir uma vantagem significativa (Novak *et al.*, 2022). Segundo, a capacidade do **NLB** de interferir em múltiplos alvos virais — M<sup>pro</sup> e RdRp — pode fornecer um efeito antiviral mais robusto em comparação ao **PAX**, que atua exclusivamente na M<sup>pro</sup> (Molavi *et al.*, 2021). Terceiro, por já estar aprovado para uso clínico em outra indicação, o **NLB** poderia ter seu processo de reaproveitamento farmacológico acelerado, diminuindo o tempo necessário para sua eventual implementação no tratamento da COVID-19.

No entanto, a toxicidade do **NLB** não pode ser ignorada. Seu uso clínico exige uma avaliação rigorosa dos riscos e benefícios, considerando seu perfil de segurança já previsto e os possíveis efeitos adversos que podem limitar sua aplicação ampla. Embora os estudos indicados forneçam uma base sólida para sua eficácia antiviral, os ensaios clínicos específicos contra a COVID-19 ainda são necessários para validar sua segurança e confirmar suas diretrizes como alternativa terapêutica. Dessa forma, o **NLB** representa um possível candidato promissor, mas que requer investigações adicionais antes de ser incorporado ao arsenal de antivirais contra o SARS-CoV-2.

Para investigar o desempenho do **NLB**, a pesquisa adota uma abordagem integrada que combina técnicas de, Modelagem Comparativa, *Docking* Molecular, avaliação de Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) e Simulações de Dinâmica Molecular (DM). O objetivo é esclarecer a capacidade do **NLB** de se ligar à M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 e explorar suas interações moleculares, contribuindo para novas estratégias terapêuticas contra a COVID-19. O **PAX** será utilizado como controle, permitindo uma comparação sólida com os resultados do **NLB**.

Estudos recentes *in silico* demonstraram a utilidade do **PAX** na identificação de inibidores potenciais da M<sup>pro</sup> (Gutti *et al.*, 2023). Ezzat *et al.* (2024) investigaram novas abordagens terapêuticas utilizando o **PAX**, enquanto Santos e Valentini (2024) exploraram a *Komaroviquinona*<sup>13</sup> como inibidor

<sup>13</sup> A *Komaroviquinona* é um composto derivado de quinonas, estudado por suas propriedades anticancerígenas e potencial atividade antimicrobiana. É relevante na pesquisa farmacêutica devido à sua capacidade de interagir com biomoléculas (Wellington, 2015).

da M<sup>pro</sup>, destacando o papel do **PAX** como controle em pesquisas semelhantes. Essa abordagem integrada permitirá uma compreensão mais profunda das aplicações terapêuticas do **NLB** na COVID-19.

Os resultados esperados da pesquisa visam não apenas indicar o potencial do **NLB** como nova possível estratégia terapêutica contra o SARS-CoV-2, mas também ajudar na reposição de fármacos existentes. Dada a urgência em desenvolver novas opções terapêuticas, este estudo busca oferecer alternativas no tratamento de infecções por coronavírus, destacando a M<sup>pro</sup> como um alvo primordial. Assim, a investigação do **NLB** pode representar um avanço significativo no arsenal terapêutico para combater a doença, complementando tratamentos emergentes e abordagens inovadoras.

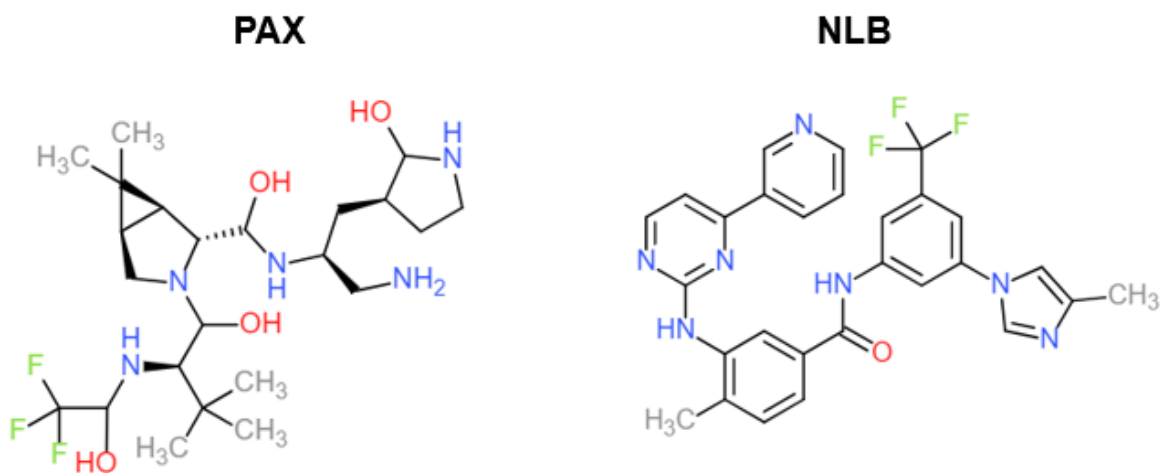


Figura 2: Estrutura em 2D dos ligantes **PAX** e **NLB**, ilustrando as características químicas e grupos funcionais presentes em cada composto.

## MÉTODOS

Nesta seção, discutiremos em detalhes a metodologia utilizada, que envolveu a modelagem comparativa da *estrutura cristalográfica*<sup>14</sup> da M<sup>pro</sup> (Código PDB: 6W6E) (Mesecar, 2020) usando o servidor Swiss-Pdb Viewer 4.1 (Guex & Peitsch, 1997) e o programa PyMOL 2.5.7 (DeLano, 2009), seguida por Simulações de DM com o programa GROMACS 5.1.4 (Abraham *et al.*, 2015; Berendsen *et al.*, 1995; Pronk *et al.*, 2013; Van Der Spoel *et al.*, 2005) para validar o modelo. Realizamos cálculos de *Docking* Molecular utilizando o programa GOLD 2022.3.0 (CCDC) (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/gold>). Por fim, selecionamos as *melhores poses*<sup>15</sup> de *Docking* Molecular para estudos adicionais de DM dos complexos escolhidos (**NLB@M<sup>pro</sup>** e **PAX@M<sup>pro</sup>**), usando o GROMACS 5.1.4.

### Modelo por Homologia

Este trabalho é baseado na estrutura cristalina da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 co-cristalizada com o ligante **X77** (N-(4-terc-butilfenil)-N-[(1R)-2-(ciclohexilamino)-2-oxo-1-(piridin-3-il)etil]-1H-imidazol-4-carboxamida) (Código PDB: 6W63). Como a estrutura da proteína estava incompleta, construímos um modelo comparativo seguindo um protocolo semelhante ao descrito por França *et al.* (2004) e posteriormente replicado por Silva *et al.* (2021; 2023; 2025)<sup>16</sup>. De acordo com os autores, a sequência FASTA completa da proteína é alinhada com sua estrutura cristalográfica incompleta usando o Swiss-Pdb Viewer 4.1.

Em nosso estudo, aplicamos a mesma abordagem, alinhando a sequência FASTA completa da M<sup>pro</sup> com a estrutura cristalográfica incompleta no Swiss-Pdb Viewer. Ajustamos manualmente os

<sup>14</sup> A *estrutura cristalográfica* é a organização tridimensional de átomos em um cristal, determinada por cristalografia de raios X. Essa técnica é determinante no desenvolvimento de fármacos, pois revela a disposição atômica e os sítios de ligação, ajudando na otimização de compostos.

<sup>15</sup> A *pose do docking* é a configuração específica de um ligante na superfície de uma proteína durante uma simulação de *Docking* Molecular. Ela inclui a posição e a orientação do ligante em relação ao sítio ativo da proteína, sendo essencial para entender as interações moleculares e o desempenho do ligante como inibidor ou modulador. A análise das poses é fundamental para selecionar candidatos promissores no desenvolvimento de novas terapias.

<sup>16</sup> França e Silva fazem parte do mesmo grupo de pesquisa em Modelagem Molecular do Instituto Militar de Engenharia (IME).

alinhamentos no PyMOL 2.5.7 para garantir que todos os resíduos, incluindo os ausentes na estrutura cristalográfica, estivessem devidamente posicionados. Os alinhamentos foram então submetidos ao modo de otimização do servidor Swiss-Model (Schwede, Kopp, Guex & Peitsch, 2003) para gerar os modelos iniciais, de forma consistente com o processo descrito por França *et al.* (2004). Essa mesma abordagem foi replicada por Silva *et al.* (2021; 2023; 2025), demonstrando sua aplicabilidade na modelagem estrutural de proteínas com regiões ausentes em estruturas cristalográficas.

Validamos o modelo usando a ferramenta Procheck (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) e acessamos ferramentas adicionais de validação no servidor PDBsum (Laskowski, Jabłońska, Pravda, Vařeková & Thornton, 2018) em <https://www.ebi.ac.uk>. Após a validação no servidor, o modelo passou por todo o processo de Simulações de DM no GROMACS 5.1.4 (Berendsen *et al.*, 1995; Hess *et al.*, 2008; Pronk *et al.*, 2013), considerando a proteína em água. O procedimento seguiu o tutorial de Lisozyma em Água de Lemkul, disponível no DM *Tutorials* (<http://www.mdtutorials.com>), assim como o trabalho recente de Lemkul, que apresenta tutoriais introdutórios para simulações de dinâmica de proteínas com GROMACS (Lemkul, 2024). Gráficos de Potencial Energético, Temperatura, Pressão, Densidade, RMSD (*Root Mean Square Deviation*) e Rg (Raio de Giração) foram gerados no XMGrace para representar a validação e estabilidade do modelo ao longo das simulações.

### Otimização dos Ligantes

As geometrias das moléculas em investigação (**NLB** e **PAX**) foram obtidas no formato "*structure data files (.sdf)*" a partir do banco de dados SWEETLEAD (Novick *et al.*, 2013). Esses compostos foram submetidos a cálculos do estado de protonação em pH fisiológico (7,4) e do coeficiente de partição (LogP) usando o programa Marvin Sketch (Marvin versão 20.8, ChemAxon® <https://www.chemaxon.com>). As estruturas tridimensionais foram construídas usando o programa PC Spartan 08® (<https://www.wavefunction.com/>), e as cargas atômicas parciais foram calculadas utilizando o método semi-empírico RM1 (*Recife Model 1*) (Rocha *et al.*, 2006).

As geometrias foram então submetidas à minimização de energia por meio de cálculos de Teoria do Funcional da Densidade (DFT) utilizando o programa ORCA v. 4.0 (Neese *et al.*, 2018). O processo de otimização foi realizado usando o funcional híbrido B3LYP (Becke, 1993; Lee, Yang & Parr, 1988) combinado com os conjuntos de base def2-TZVP (Weigend & Ahlrichs, 2005) e 6-31G\* (Hehre *et al.*, 1972). A otimização foi conduzida de forma sequencial, começando com o conjunto de base 6-31G\* para uma pré-otimização mais rápida, seguida por outro conjunto def2-TZVP para uma otimização refinada, garantindo maior precisão nos resultados.

Os mínimos de energia foram confirmados por análise de frequência vibracional para obtenção dos valores de Entalpia (*H*), Entropia (*S*) e Energia Livre de Gibbs (*G*). Todos os cálculos de DFT foram realizados para uma molécula única na fase gasosa a 0 K e executados no *Supercomputador Sdumont*<sup>17</sup> do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) (<https://www.gov.br/lncc>). Os resultados da otimização geométrica foram usados como entrada para os estudos de *Docking* Molecular e analisados para obter informações sobre estrutura eletrônica e parâmetros de reatividade. Os programas PC Spartan 08® (Wavefunction, Inc. Irvine, CA) e Avogadro v. 2.1 (Hanwell *et al.*, 2012) (<https://avogadro.cc/>) foram usados para desenho, visualização, edição de estruturas e pré-otimização.

O fluxo de trabalho computacional no SDumont envolveu etapas individuais de Pré-Otimização Geométrica (Pré-OPT), Otimização Geométrica (OPT) e Frequências Vibracionais (FREQ). Essas etapas fornecem uma abordagem sistemática para ajustar a geometria molecular, garantindo que as estruturas resultantes sejam energeticamente estáveis e representativas dos mínimos de energia. Os ligantes otimizados foram então salvos nos formatos ".mol2" e ".pdb" para os cálculos de *Docking* Molecular. Vale destacar que o ligante co-cristalizado **X77** foi submetido ao mesmo processo, garantindo a consistência na abordagem metodológica.

<sup>17</sup> O *SDumont* é um supercomputador do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) no Brasil, voltado para simulações de alta performance em áreas como bioinformática e modelagem molecular, contribuindo para o avanço científico no país.

## Cálculos de Docking Molecular

A M<sup>pro</sup> foi preparada removendo o ligante co-cristalizado<sup>18</sup> **X77** e as moléculas de água cristalográficas<sup>19</sup>. O procedimento de *Docking* foi conduzido no sítio de ligação do ligante co-cristalizado **X77**, utilizando o programa GOLD 2022.3.0 (CCDC). A caixa de grade foi gerada com base no sítio de ligação do **X77**, com os seguintes parâmetros: centro x = -19.682, centro y = 20.621, centro z = -26.849. O *Docking* foi realizado utilizando as quatro funções de pontuação disponíveis no programa (*GoldScore*, *ChemPLP*, *ChemScore* e *Asp*) (Eldridge, 1997; Gehlhaar, 1995; Jones, 1997; Mooij, 2005). Diversas poses foram geradas usando um algoritmo genético, atribuindo uma pontuação de adequação a cada pose. Pontuações mais altas indicam maior interação entre o inibidor e o sítio ativo da proteína.

Em cada execução de cálculo de *Docking*, o tamanho do raio dos átomos selecionados ao redor do sítio de ligação do ligante co-cristalizado foi variado, começando em 5 Ångströms (Å) e aumentando para 10, 15, 20 e 25 Å. Os resultados mais promissores foram obtidos com um raio de 15 Å, utilizando a função *GoldScore* (Jones, 1997), demonstrando melhor interação entre os ligantes e o sítio ativo da proteína.

A função *GoldScore* (Jones, 1997) foi escolhida para experimentações adicionais devido à sua capacidade na avaliação das interações dos complexos ligante-proteína, especialmente em interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A melhor pose de cada complexo foi exportada em formato ".pdb" para análise subsequente. Estudos anteriores demonstraram seu sucesso, incluindo modificações em derivados de *Ebselen*<sup>20</sup> para melhorar a atividade antiviral contra o SARS-CoV-2 (Qiao *et al.*, 2021). Da mesma forma, o trabalho de Azevedo *et al.* (2022) ilustra como a função *GoldScore* foi aplicada com sucesso na construção de modelos preditivos para a atividade inibitória de tiazolopiridinil-ureias sobre a subunidade B da DNA girase de *Mycobacterium tuberculosis*, demonstrando a versatilidade dessa ferramenta em diferentes contextos de *docking* molecular. Além disso, Bassani *et al.* (2022) demonstraram a capacidade da função *GoldScore* em reproduzir os modos de ligação de inibidores não covalentes da protease M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, ressaltando a importância de métodos precisos na avaliação de interações.

Nos cálculos de *Docking*, os ligantes foram definidos como estruturas flexíveis, enquanto a proteína foi tratada como uma estrutura rígida. Os resultados e as figuras foram analisados e preparados utilizando o Discovery Studio Visualizer (<https://www.3ds.com/discovery-studio>) e PyMOL 2.5.7. O *Redocking*<sup>21</sup> do **X77** co-cristalizado na M<sup>pro</sup> resultou em um valor de RMSD de 0,94 Å, que é  $\leq 2,0$  Å e, portanto, considerado suficiente para validar o protocolo de *Docking* utilizado, conforme destacado na literatura (Dias *et al.* 2008).

## Perfil ADMET

Para prever as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas dos compostos, utilizamos o servidor online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), garantindo a conformidade com a Regra dos Cinco de Lipinski (RO5) (Lipinski *et al.*, 2012). De acordo com a RO5, um candidato a fármaco ideal deve ter propriedades moleculares que atendam a limites específicos: um LogP  $\leq 5,0$ , uma massa molecular  $\leq 500$  Da, no máximo 10 aceptadores de ligações de hidrogênio e no máximo 5 doadores de ligações de hidrogênio. Um valor de LogP superior a 5,0 sugere que um composto é muito lipofílico, o que pode dificultar sua capacidade de difundir adequadamente através da membrana plasmática, uma vez que terá maior afinidade pela bicamada lipídica, potencialmente limitando sua

<sup>18</sup> Um ligante co-cristalizado é uma molécula que se liga a uma proteína durante a formação de cristais, permitindo a determinação da estrutura tridimensional da proteína-ligante. Essa técnica é valiosa para o desenvolvimento de fármacos, pois fornece *insights* sobre a interação entre ligante e proteína, ajudando a otimizar compostos para maior afinidade e especificidade.

<sup>19</sup> As águas cristalográficas são moléculas de água incorporadas na rede de cristalização de proteínas. Elas estabilizam a estrutura do cristal e influenciam as interações moleculares, sendo importantes para entender a afinidade e a especificidade dos ligantes no *design* de fármacos.

<sup>20</sup> *Ebselen* é um composto orgânico com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, demonstrando atividade antiviral ao inibir proteases, como a M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, e potencial em doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Sun *et al.*, 2021).

<sup>21</sup> O *Redocking* reavalia ligantes acoplados previamente a uma proteína, utilizando a mesma estrutura ou uma versão modificada. Essa técnica valida resultados de *Docking* anteriores e ajuda a refinar as poses dos ligantes para selecionar candidatos promissores.

capacidade de atingir o citoplasma (Piccirillo & Amaral, 2018).

Além disso, empregamos o servidor ProTox-3.0 (<https://tox.charite.de/protox3>) para avaliar o perfil ADMET dos ligantes, fornecendo uma avaliação abrangente de suas características toxicológicas e farmacocinéticas.

Nesse contexto, as estruturas otimizadas das moléculas estudadas, obtidas em formato “.mol2”, foram convertidas para o formato “SMILES” para permitir o cálculo dos parâmetros ADMET utilizando os servidores SwissADME e ProTox-3.0.

### Dinâmica Molecular dos Complexos

As Simulações de DM foram realizadas usando parâmetros ligados e não ligados para o campo de força CHARMM (Mackerell Jr, Banavali N., Foloppe, 2000). As coordenadas tridimensionais e a topologia da proteína (SARS-CoV-2 M<sup>pro</sup>, código PDB 6W63) foram geradas utilizando o programa pdb2gmx, que faz parte do pacote GROMACS 5.1.4. O programa ACPYPE (Sousa da Silva & Vranken, 2012) foi utilizado para gerar os arquivos de topologia e coordenadas dos ligantes, que foram então submetidos a Simulações de DM.

Os complexos ligante proteína (**NLB@M<sup>pro</sup>** e **PAX@M<sup>pro</sup>**) foram colocados em uma caixa cúbica sob condições de contorno periódicas (Martínez, Borin, Skaf, 2007). O efeito do solvente foi simulado utilizando o modelo de água SPC (Fuhrmans *et al.*, 2010; Jorgensen *et al.*, 1983). Os dados sobre o volume e as dimensões da caixa, o número de íons adicionados para neutralização eletrostática do sistema e o número de moléculas de água SPC estão detalhados na Tabela 1. Os complexos ligante proteína foi envolto em uma caixa cúbica com comprimento de aresta de 9,0 nm sob condições de contorno periódicas, com efeitos do solvente reproduzidos usando o modelo de água SPC. Todos os sistemas passaram por dois estágios de minimização utilizando o algoritmo do gradiente descendente com critério de convergência de 10,0 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-1</sup>. O primeiro estágio foi realizado com restrições de posição, e o segundo sem restrições.

A equalização de pressão e temperatura foi alcançada através de simulações usando o *ensemble* canônico (NVT), mantendo número de partículas, volume e temperatura constantes por 100 ps, seguida de uma simulação no *ensemble* isoterma-isobárico (NpT), mantendo número de partículas, pressão e temperatura constantes por outros 100 ps (Jaroslaw *et al.*, 2005). Todas as simulações de DM foram conduzidas a 310 K e 1 bar, com um passo de integração de 2 fs, e listas de pares foram atualizadas a cada 5 passos.

Condições de contorno periódicas foram consideradas, com um corte de 1,0 nm para interações não ligadas. O método *Particle-Mesh Ewald* (PME) (Deserno & Holm, 1998; Oh & Deng, 2007), com interações no espaço real truncadas a um raio de corte de 1,0 nm, foi utilizado para descrever as forças eletrostáticas de longo alcance. A temperatura foi controlada usando o método de reescalonamento estocástico de velocidades (Bussi *et al.*, 2007), com constante de tempo de 1 ps. Para a pressão, foi empregado o barostato de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984), com constante de tempo de 5 ps.

No primeiro estágio, a energia dos sistemas foi minimizada para alcançar uma convergência de 200 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-1</sup> utilizando o método do gradiente descendente (Morse & Feshbach, 1946) para evitar contatos atômicos desfavoráveis. No segundo estágio, 500 ps de simulação de DM foram realizados para equilibrar o solvente, enquanto a M<sup>pro</sup> foi mantida parcialmente rígida por meio da imposição de um potencial de restrição posicional com uma constante de força de 1000 kJ·mol<sup>-1</sup>·nm<sup>-2</sup>. No estágio final, foram realizadas simulações de DM de 300 ns para os complexos ligante proteína. Um passo de integração de 40 fs foi utilizado, com ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio restringidas pelo método *P-LINCS* (Hess, 2008). O algoritmo *leap-frog* (Berendsen, 2004) foi utilizado para integrar as equações de movimento. Todas as simulações de DM foram realizadas usando o pacote GROMACS 5.1.4 (Berendsen *et al.*, 1995; Hess *et al.*, 2008; Pronk *et al.*, 2013) no supercomputador Sdumont do LNCC, por meio de *scripts*.

O programa QTGrace (<https://sourceforge.net/qtgrace/>) foi empregado para a geração de gráficos de desvio quadrático médio (RMSD), flutuações quadráticas médias (RMSF), raio de giro (Rg) e área

de superfície acessível ao solvente (SASA). As trajetórias das simulações foram visualizadas usando o programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (<http://www.ks.uiuc.edu/vmd>). Gráficos de interação versus resíduo em regiões-chave do sítio ativo foram gerados usando o programa Gnuplot (<http://www.gnuplot>).

Tabela 1: Parâmetros do sistema e da caixa de simulação para as Simulações de DM a 310K dos complexos **NLB@M<sup>pro</sup>** e **PAX@M<sup>pro</sup>**

Parâmetro	<b>NLB@M<sup>pro</sup></b>	<b>PAX@M<sup>pro</sup></b>
Dimensões da caixa (nm)	6,134 x 4,002 x 6,543	6,811 x 5,606 x 4,520
Volume da caixa (nm <sup>3</sup> )	946.548	902,112 nm <sup>3</sup>
Número de moléculas de água	29,685	28,056
Neutralização eletrostática	4 Na <sup>+</sup>	4 Na <sup>+</sup>

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Construção do Modelo Comparativo

O modelo comparativo foi validado conforme descrito na seção experimental e alinhado com a estrutura cristalográfica (código PDB: 6W63) para comparar as sequências de aminoácidos e identificar semelhanças ou discrepâncias entre elas. Os resultados do alinhamento e do cálculo de RMSD indicam um bom nível de concordância entre as estruturas comparadas. Um total de 305 resíduos foram alinhados, refletindo uma alta qualidade do alinhamento geral, com um RMSD de 0,32 nm (Figura 3).

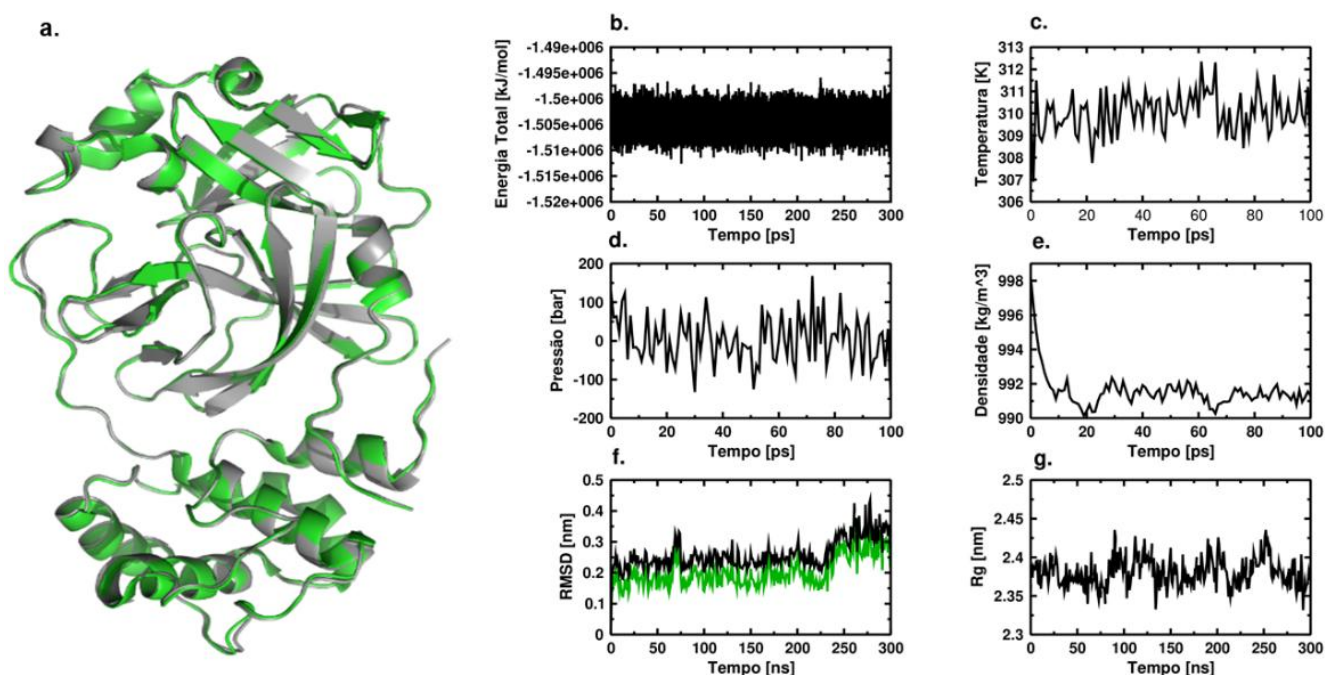


Figura 3: a. Sobreposição das estruturas entre o modelo comparativo e a estrutura cristalográfica de M<sup>pro</sup>. O modelo de M<sup>pro</sup> está representado em cinza, enquanto a estrutura cristalográfica (código PDB: 6W63) é mostrada em verde. b. Variação da Energia Total ao longo da simulação [kJ/mol]. c. Perfil da Temperatura durante a simulação [K]. d. Variação da Pressão ao longo da simulação [bar]. e. Densidade do sistema durante a simulação [kg/m<sup>3</sup>]. f. Desvio Quadrático Médio das estruturas (RMSD) [nm], com o modelo representado em preto e a estrutura cristalográfica em verde. g. Raio de Giração (Rg) [nm].

### Estudos de Docking Molecular

A Tabela 2 apresenta as melhores poses de *Docking* dos ligantes **NLB**, **PAX** e do *Redocking* do inibidor **X77** na M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2, com base na função de pontuação *GoldScore*, usando o programa GOLD 2022.3.0.

O ligante **NLB** alcançou a maior pontuação de *Docking*, com um valor de 71,63, interagindo com diversos resíduos no sítio ativo, incluindo His41 e Cys145, que fazem parte da díade catalítica da M<sup>pro</sup> (Nguyen *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Essas interações são importantes, pois His41 e Cys145 são

vitais para a atividade enzimática da M<sup>pro</sup>, sendo responsáveis pela catálise do processamento das proteínas virais. Além dos resíduos da díade catalítica, o **NLB** também forma interações significativas com outros resíduos como Cys44, Ser46, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, His163, His164, Met165 e Glu166. Esses contatos adicionais são importantes para a estabilização do ligante dentro do sítio ativo, contribuindo para o posicionamento e a orientação do **NLB** de forma a maximizar seu potencial inibitório. Resíduos como Glu166 e His164, por exemplo, são conhecidos por desempenharem um papel na formação da estrutura do sítio ativo e na estabilização de ligantes. A interação com Met49 e Phe140 também sugere um encaixe adequado do **NLB** na cavidade hidrofóbica da M<sup>pro</sup>, aumentando sua afinidade e, potencialmente, seu desempenho como inibidor. A combinação dessas interações com os resíduos da díade catalítica e outros resíduos do sítio ativo reforça o potencial do **NLB** em atuar como um inibidor potente da M<sup>pro</sup>.

O inibidor **X77**, que também obteve a pontuação de *Redocking*, 76,19, formou interações com os mesmos resíduos da díade catalítica (His41 e Cys145), além de outros resíduos como Thr26, Met49, e Glu166, que contribuem para estabilizar o ligante no sítio de ligação. A presença de interações com esses resíduos indica uma alta afinidade do **X77** pelo sítio ativo da M<sup>pro</sup>, o que justifica seu rendimento como inibidor.

Já o ligante **PAX**, com uma pontuação de 64,21, interage com resíduos como Phe140, His163 e Met165, mas não estabelece contatos diretos com os resíduos da díade catalítica (His41 e Cys145). Embora sua afinidade seja significativa, a ausência de interações diretas com os principais componentes da díade catalítica pode sugerir uma eficácia menor em relação ao **X77** e ao **NLB** no bloqueio direto da atividade catalítica da M<sup>pro</sup>.

Tabela 2. Melhores Poses de *Docking* dos Ligantes e *Redocking* de **X77** na M<sup>pro</sup> Usando a Função *GoldScore* no programa GOLD 2022.3.0.

Ligantes	Pontuação	Afinidade
<b>NLB</b>	71.63	His41, Cys44, Ser46, Met49, Phe140, Leu141, Asn142, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166
<b>PAX</b>	64,21	Phe140, His163, Met165, Leu167, Pro168
<b>X77</b>	76,19	Thr26, Leu27, His41, Met49, Leu141, Asn142, Gly143, Cys145, Met165, Glu166

A análise das interações entre o **NLB** e resíduos da enzima M<sup>pro</sup> revela um conjunto significativo de interações e contatos que contribuem para a estabilidade do complexo. Essas interações são ilustradas nas imagens da Figura 4, que mostra uma ampliação das interações no sítio ativo e a Figura 5 apresenta um mapa 2D das interações citadas.

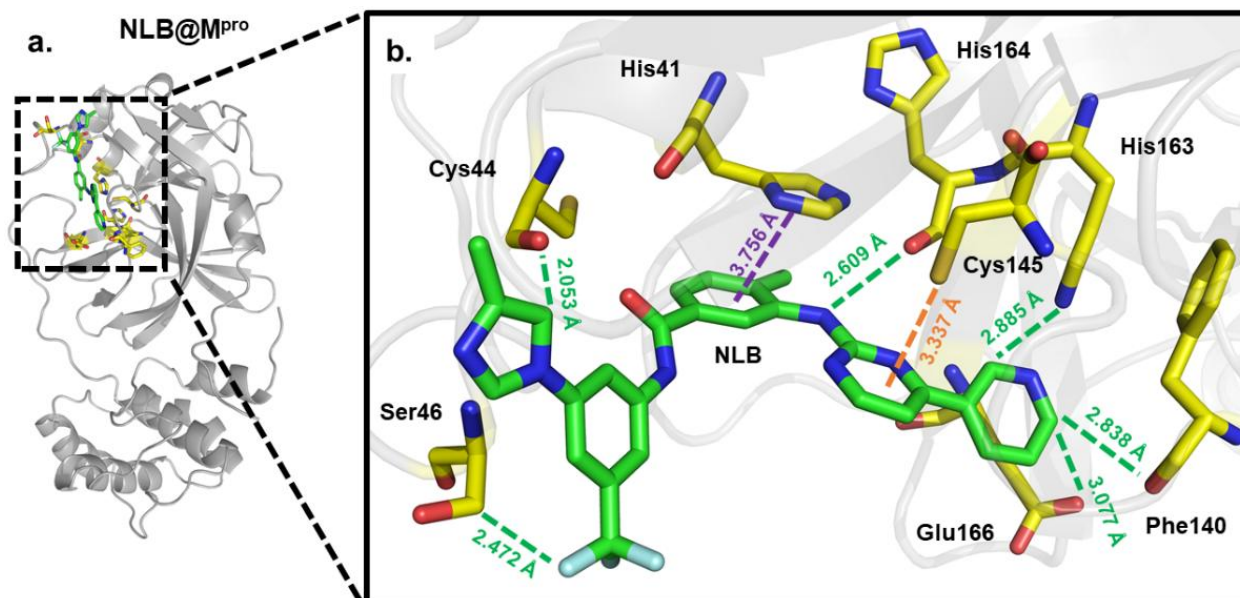


Figura 4: Pose de *Docking* do **NLB** no Sítio Ativo da M<sup>pro</sup> Destacando Interações Chave com Resíduos. Legenda: Pose de *Docking* do **NLB** no sítio de ligação da M<sup>pro</sup>. Átomos de hidrogênio foram removidos para melhor visualização. O painel **a.** apresenta a pose geral do **NLB** (bastão verdes) dentro do sítio ativo da M<sup>pro</sup> (cartoon cinza). O painel **b.** oferece uma visão ampliada que enfatiza os resíduos da diade catalítica His41 e Cys145 (bastão amarelo), além dos resíduos His41, Ser46, Cys44, Phe140, His163, His164 e Glu166 (também em bastão amarelo), todos envolvidos em diversas interações com o ligante **NLB**. As distâncias das interações incluem: His164-**NLB** (2,609 Å), Ser46-**NLB** (2,472 Å), Cys44-**NLB** (2,053 Å), Phe140-**NLB** (2,838 Å), Glu166-**NLB** (3,077 Å) e His163-**NLB** (2,885 Å). Os pontilhados verdes indicam interações do tipo ligação de hidrogênio, o laranja representa a interação  $\pi$ -Sulfur (Cys145-**NLB** a 3,337 Å) e o roxo refere-se às interações  $\pi$ - $\pi$  empilhadas (His41-**NLB** a 3,756 Å). Esta visualização destaca as interações críticas entre o **NLB** e os resíduos chave no sítio ativo da M<sup>pro</sup>.

Destaca-se a ligação de hidrogênio entre **NLB** e His164, com uma distância de 2,61 Å, que é estratégico para a estabilização (Figura 4). Essa interação, assim como as demais analisadas, foram identificadas usando o programa *Discovery Studio BIOVIA*, que considera como ligação de hidrogênio aquelas interações que possuem distâncias entre 2,4 e 3,5 Å, com ângulos de doador-aceptor preferencialmente acima de 90°, garantindo uma geometria favorável para a formação da ligação (BIOVIA, Dassault Systèmes, 2020; Ahmed *et al.*, 2022). Outras interações do tipo ligação de hidrogênio foram observadas com Ser46 (2,47 Å), Cys44 (2,05 Å) e Phe140 (2,84 Å), que, apesar de mais fracas, ajudam a manter o ligante no sítio ativo. Interações adicionais incluem ligações com Glu166 (3,08 Å) e His163 (2,89 Å), que favorecem a orientação do ligante. A interação  $\pi$ -Sulfur entre **NLB** e o átomo de enxofre de Cys145 (3,34 Å) é notável, pois posiciona o **NLB** próximo à região catalítica, enquanto as interações  $\pi$ - $\pi$  empilhadas entre **NLB** e His41 (distâncias de 3,76 Å e 5,61 Å) indicam uma acomodação favorável do ligante.

Além das ligações de hidrogênio, o **NLB** também apresenta interações hidrofóbicas relevantes, como a interação Amido-  $\pi$  empilhada entre Leu141-Asn142 (4,07 Å), e interações do tipo Alquil com Met165 (4,09 Å) e His41 (3,90 Å), que estabilizam o ligante na região hidrofóbica do sítio ativo. As interações  $\pi$ -Alquil com Cys44 (5,10 Å) e Met49 (distâncias de 4,75 Å e 5,25 Å) sugerem que o **NLB** se acomoda bem na cavidade hidrofóbica, inerente para a formação de um complexo estável.

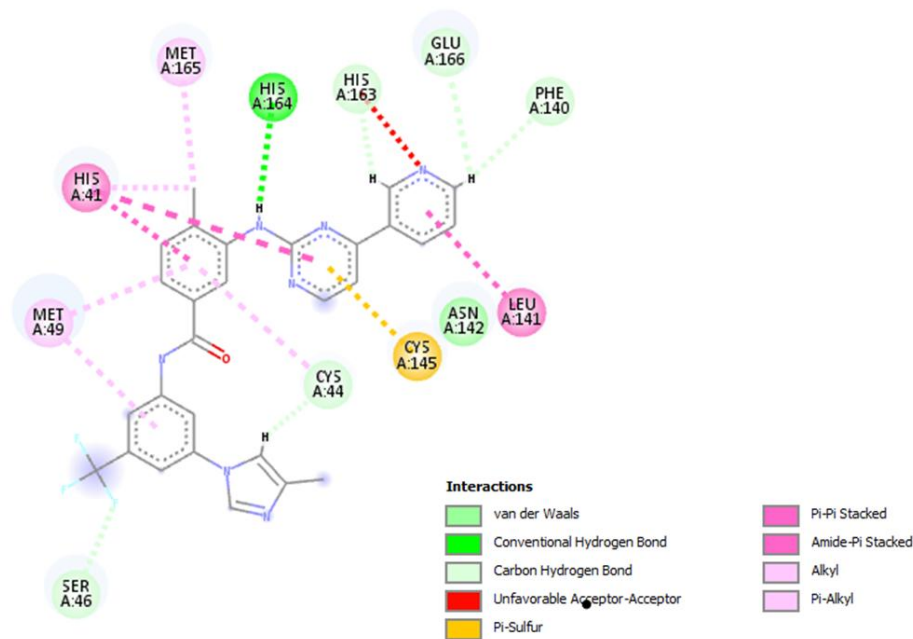


Figura 5: Diagrama 2D das Interações do **NLB** com Resíduos do Sítio Ativo da M<sup>Pro</sup>.

**Análises ADMET**

A Tabela 3 compara as propriedades físico-químicas e farmacológicas previstas dos ligantes **NLB** e **PAX**. O **PAX** apresenta maior potencial para formar ligações de hidrogênio, com 12 aceitadores e 3 doadores, em contraste com os 8 aceitadores e 2 doadores do **NLB**. Em termos de flexibilidade, o **PAX** possui 12 rotações livres, enquanto o **NLB** tem 8, sugerindo maior conformacionalidade para o **PAX**. O **NLB** apresenta uma Área de Superfície Polar Topológica (TPSA) de 141,08 Å<sup>2</sup>, indicando maior capacidade de interações polares em comparação ao **PAX**, com TPSA de 39,33 Å<sup>2</sup>. Além disso, o **NLB** é mais acessível em termos de síntese, com um valor de 3,81 contra 5,21 do **PAX**.

Tabela 3: Comparação do Potencial de Ligações de Hidrogênio, Flexibilidade e Acessibilidade Sintética de **NLB** e **PAX**.

Ligantes	NLB	PAX
Fórmula	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> F <sub>3</sub> N <sub>7</sub> O	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> F <sub>3</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
MW (g.mol <sup>-1</sup> )	529.52	499.53
H-Ac	8	12
H-Do	2	3
N.rot	8	12
TPSA (Å <sup>2</sup> )	141.08	39.33
Acessibilidade Sintética	3.81	5.21

Legenda: Fórmula refere-se à fórmula química do composto. MW significa peso molecular em gramas por mol. H-Ac indica o número de aceptores de hidrogênios, enquanto H-Do representa o número de doadores de hidrogênio. N.rot é o número de ligações rotacionais na molécula. TPSA (Å<sup>2</sup>) denota a área de superfície polar total em angstroms quadrados. A Acessibilidade Sintética mede a facilidade de síntese do composto, com valores mais altos indicando maior dificuldade.

A Tabela 4 compara as propriedades farmacológicas e toxicológicas previstas dos ligantes **NLB** e **PAX**. O **NLB** é previsto como ativo em relação à hepatotoxicidade, neurotoxicidade, carcinogenicidade e imunotoxicidade, enquanto o **PAX** apresenta apenas neurotoxicidade, sugerindo um perfil de segurança ligeiramente melhor. Em toxicidade aguda, ambos têm valores de LD<sub>50</sub> elevados (**NLB**: 800 mg/kg; **PAX**: 708 mg/kg), com **NLB** sendo levemente superior. O **NLB** é mais lipofílico (LogP de 4,68) e possui baixa absorção gastrointestinal, ao contrário do **PAX** (LogP de 1,45) com alta absorção GI. Apenas o **PAX** tem permeabilidade ao sangue-cérebro (BBB)<sup>22</sup>, relevante para ações no sistema nervoso central. Ambos inibem o CYP3A4, mas o **NLB** inibe outras enzimas, o que

<sup>22</sup> A sigla BBB refere-se à Blood-Brain Barrier (barreira hematoencefálica), uma estrutura fisiológica que protege o sistema nervoso central, controlando a passagem de substâncias entre o sangue e o cérebro.

pode aumentar a complexidade de interações medicamentosas. Eles atendem à regra de Lipinski, mas não aos critérios de Ghose, com biodisponibilidade prevista de 0,55.

Tabela 4: Perfil ADMET dos Ligantes **NLB** e **PAX**

Propriedades	<b>NLB</b>	<b>PAX</b>
Hepatotoxicidade	Ativo	Inativo
Neurotoxicidade	Ativo	Ativo
Cardiotoxicidade	Inativo	Inativo
Carcinogenicidade	Ativo	Inativo
Imunotoxicidade	Ativo	Inativo
Mutagenicidade	Inativo	Inativo
Citotoxicidade	Inativo	Inativo
LD <sub>50</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	800	708
LogP	4,68	1,45
Absorção GI	Baixa	Alta
Permeabilidade BBB	Não	Sim
Inibidor de CYP1A2	Não	Não
Inibidor de CYP2C19	Sim	Não
Inibidor de CYP2C9	Sim	Não
Inibidor de CYP2D6	Sim	Não
Inibidor de CYP3A4	Sim	Sim
<i>Lipinski</i>	Sim	Sim
<i>Ghose</i>	Não	Não
Biodisponibilidade	0,55	0,55

Legenda: Hepatotoxicidade refere-se à toxicidade no fígado, neurotoxicidade ao dano no sistema nervoso e cardiotoxicidade ao dano no coração. Carcinogenicidade é o potencial de causar câncer, enquanto a imunotoxicidade afeta o sistema imunológico. Mutagenicidade indica o potencial para mutações genéticas, e citotoxicidade refere-se à toxicidade celular. LD<sub>50</sub> é a dose letal para 50% dos sujeitos (mg por kg). LogP mede a hidrofobicidade. A absorção gastrointestinal indica quão bem uma substância é absorvida no trato gastrointestinal. A permeabilidade à barreira hematoencefálica refere-se à capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Inibidores de CYP (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) bloqueiam enzimas metabólicas específicas. *Lipinski* e *Ghose* avaliam a similaridade com drogas, e a biodisponibilidade refere-se à fração de um fármaco que atinge a circulação sistêmica.

### Análises das Simulações de Dinâmica Molecular

O RMSD apresentado para os ligantes (Figura 6a) no complexo **NLB**@M<sup>pro</sup> (azul) (> 1 Å) indicou uma menor estabilidade em comparação ao complexo **PAX**@M<sup>pro</sup>. Durante os primeiros 50 ns de simulação, o **NLB** apresentou variações entre 0,3 nm e 0,4 nm, caindo para 0,25 nm entre 50 ns e 100 ns. Em seguida, o RMSD aumentou novamente para cerca de 0,4 nm entre 150 e 200 ns, estabilizando-se entre 0,2 nm e 0,3 nm até 250 ns e terminando em torno de 0,15 nm até o final dos 300 ns. Em contraste, o **PAX** manteve-se praticamente constante durante todo o período de 300 ns, variando entre 0,1 nm e 0,2 nm, com um nível crescente a partir de 200 ns, alcançando 0,3 nm e mantendo esse valor até o final da simulação.

O RMSD das proteínas complexadas com **NLB** (azul) e **PAX** (preto) é apresentado na Figura 6b. Durante a simulação, a proteína M<sup>pro</sup> no complexo **NLB**@M<sup>pro</sup> exibiu uma variação crescente de RMSD, oscilando entre 0,25 nm e 1,3 nm. Em contraste, o complexo **PAX**@M<sup>pro</sup> mostrou uma estabilidade inicial, mantendo o RMSD em torno de 0,25 nm nos primeiros 150 ns. No entanto, a partir de 160 ns, houve um aumento acentuado para 0,80 nm, permanecendo estável nesse valor até o final dos 300 ns de simulação.

Uma análise do Raio de giração (Rg) revelou que, no início da simulação, a proteína no complexo **NLB**@M<sup>pro</sup> apresentou um comportamento semelhante ao da proteína no complexo **PAX**@M<sup>pro</sup>, com valores médios muito próximos nos primeiros 150 ns de simulação (2,235 nm para ambos). Após esse período, o Rg do **NLB**@M<sup>pro</sup> exibiu flutuações, variando entre 2,15 e 2,10 nm e mantendo-se nessa faixa até o final dos 300 ns (Figura 6c).

Os valores médios de área de superfície acessíveis ao solvente (SASA) (Figura 6d) para o complexo **PAX**@M<sup>pro</sup> foram de 150 nm<sup>2</sup>, com uma leve flutuação até 157 nm<sup>2</sup> em 175 ns. Em seguida, os valores

diminuíram para uma média de 145 nm<sup>2</sup> em 225 ns, retornando a 150 nm<sup>2</sup> a partir de 250 ns e mantendo-se resultante até o final da simulação de 300 ns. Por outro lado, o complexo **NLB**@M<sup>pro</sup> começou com 147 nm<sup>2</sup> e aumentou rapidamente para 160 nm<sup>2</sup> nos primeiros 50 ns, mantendo-se entre 155 nm<sup>2</sup> e 160 nm<sup>2</sup> até o termo dos 300 ns.

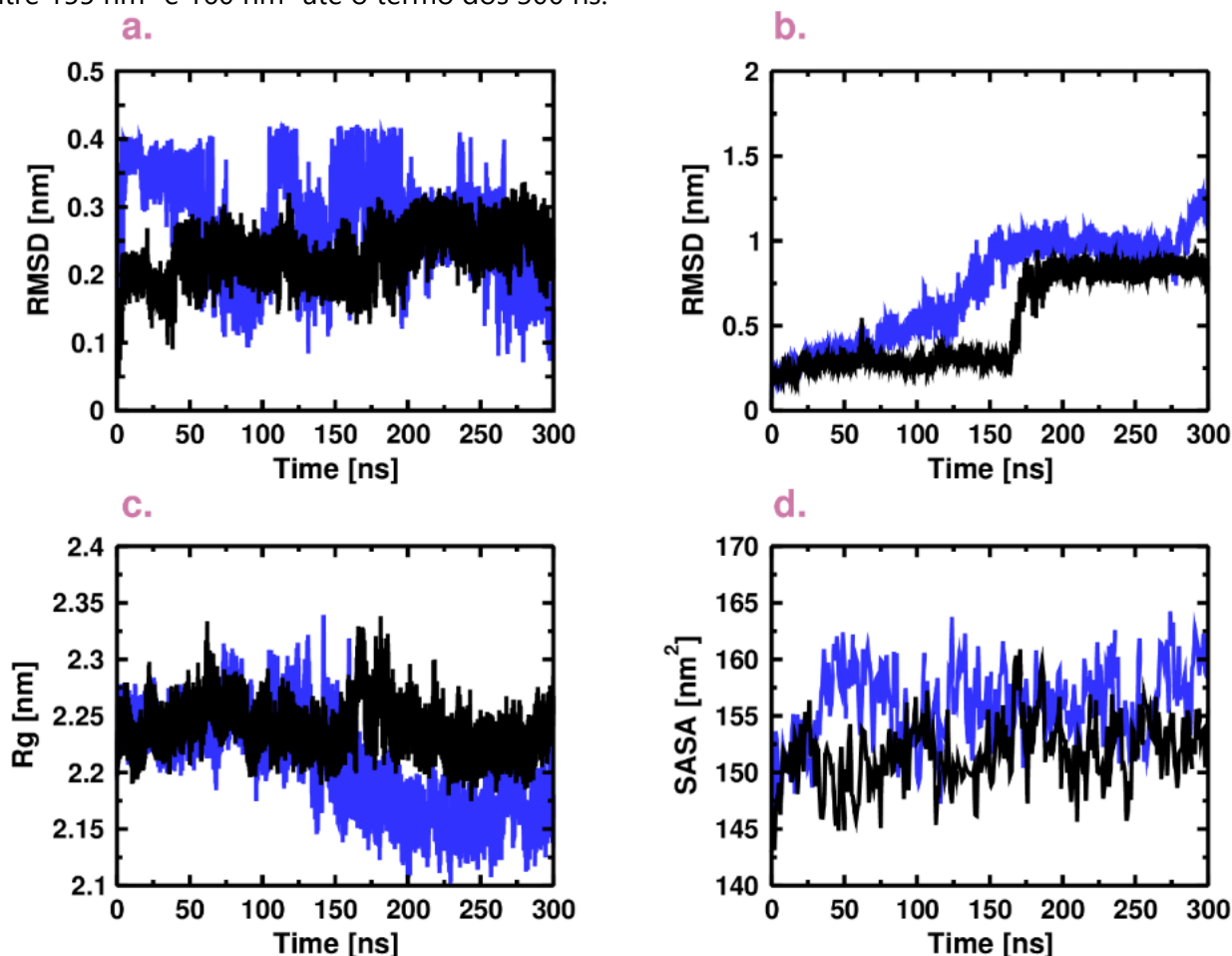


Figura 6. a. RMSD dos ligantes **NLB** (azul) e **PAX** (preto) complexado com M<sup>pro</sup>. b. RMSD das proteínas complexadas com **NLB** (azul) e **PAX** (preto). c. Variações da Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) para M<sup>pro</sup> complexado com **NLB** (azul) e **PAX** (preto). d. Rg (Raio de Giração) para **NLB** (azul) e **PAX** (preto) complexado com M<sup>pro</sup>.

Os gráficos de RMSF apresentados na Figura 7 oferecem uma visão detalhada da flexibilidade estrutural da proteína M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 quando em complexos com os ligantes **NLB** (azul) e **PAX** (preto) durante uma Simulação de DM. O RMSF é uma métrica central para avaliar a mobilidade de cada resíduo da proteína ao longo da simulação, permitindo identificar quais regiões são mais flexíveis e quais permanecem mais estáveis. Na análise dos gráficos, observa-se que os resíduos que apresentam flutuações elevadas (RMSF superiores a 0,9 nm) estão predominantemente localizados nas regiões de *loop*, especialmente nos terminais N e C da proteína, bem como nas áreas próximas aos "*linker loops*" que conectam os domínios II e III da M<sup>pro</sup>. A alta flexibilidade nessas regiões é esperada, uma vez que os *loops* geralmente têm funções estruturais de conexão e são menos restritos em sua movimentação durante a dinâmica molecular.

Em contraste, resíduos catalíticos e estruturalmente críticos, como His41 e Cys145, que formam a díade catalítica, apresentam flutuações significativamente menores, com valores de RMSF abaixo de 0,25 nm. Outros resíduos fundamentais para a manutenção da estrutura e função do sítio ativo, como Glu166, Phe140, His163 e His164, também demonstram pouca variabilidade ao longo da simulação. Essa baixa flutuação indica que essas áreas permanecem estruturalmente rígidas, mantendo uma conformação estável, o que é vital para garantir a atividade catalítica da M<sup>pro</sup> e a correta interação com os ligantes.

A estabilidade dessas regiões de baixa flutuação sugere que, mesmo com a interação dos ligantes, as partes mais críticas do sítio ativo da M<sup>pro</sup> são preservadas, contribuindo para a manutenção de sua

funcionalidade enzimática. Já as regiões mais flexíveis podem ser importantes para acomodar variações conformacionais que favorecem a interação com diferentes ligantes, como o **NLB** e o **PAX**. Essa combinação de estabilidade em áreas críticas e flexibilidade em regiões menos estruturadas é um aspecto substancial para a dinâmica funcional da M<sup>pro</sup> no contexto da inibição antiviral.

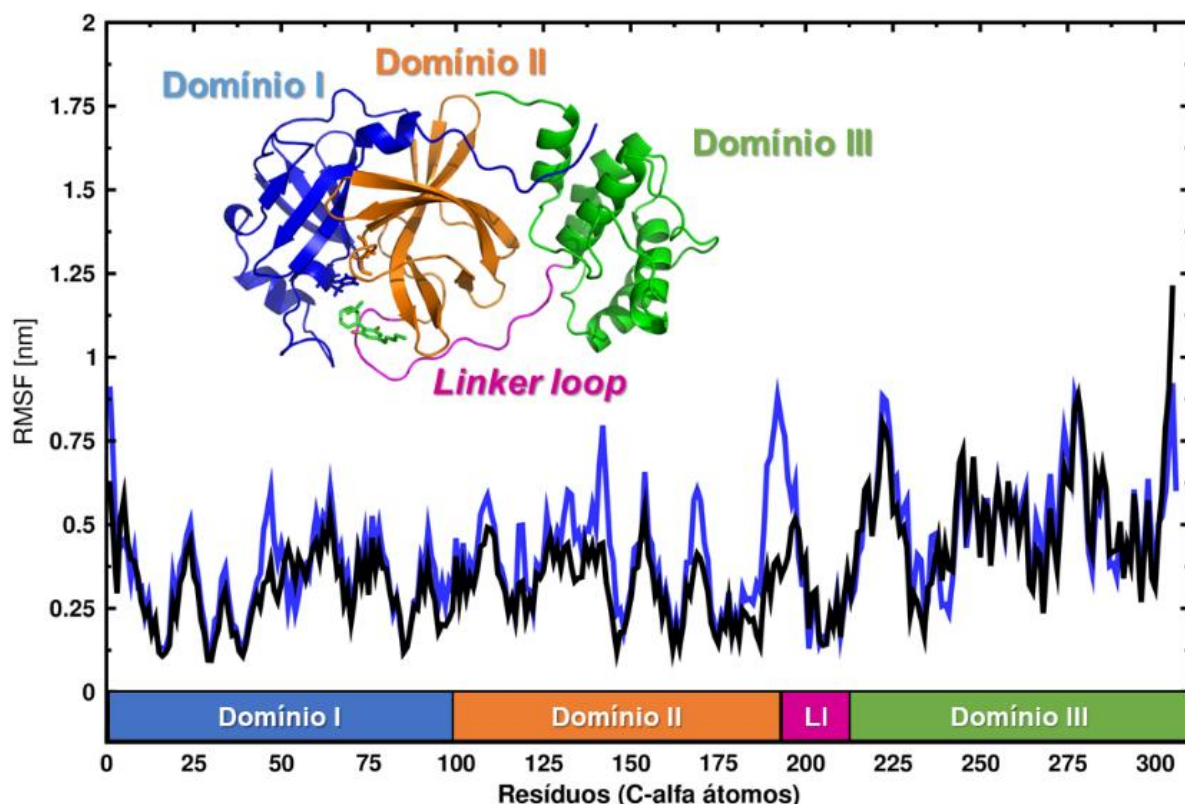


Figura 7. Flutuação Média Quadrática dos Resíduos (RMSF) da M<sup>pro</sup> em Complexo com **NLB** (azul) e **PAX** (preto) durante a Simulação de DM.

O gráfico de interação versus resíduos (Figura 8) da simulação de DM mostra que os ligantes interagem de forma consistente com resíduos nas regiões de His41-Pro52 e His163-Ala173 ao longo da simulação. Essas regiões correspondem, respectivamente, a partes do subsítio S2, que é hidrofóbico, e do subsítio S1, que é mais polar, o que sugere um equilíbrio nas interações entre zonas hidrofóbicas e polares da M<sup>pro</sup>. Notavelmente, o **PAX** (preto) exibiu interações mais intensas com os resíduos das regiões Gly23-Leu27 e Phe140-Cys145, que são adjacentes ao subsítio S1 e ao S1'. As regiões Gly23-Leu27 são caracterizadas por uma maior polaridade, sugerindo que o **PAX** tem um perfil que favorece ligações de hidrogênio e interações polares, como identificado previamente na análise da ligação de hidrogênio com His164. Já a região Phe140-Cys145, embora polar, também possui elementos que facilitam interações de van der Waals, o que pode explicar a forte afinidade do **PAX** por essa área. Essa correlação entre as análises reforça o perfil do **PAX** em se ligar preferencialmente a locais que favorecem tanto interações polares quanto de van der Waals, resultando em uma interação equilibrada e robusta com a M<sup>pro</sup> (Citarella *et al.*, 2023; Ezzat *et al.*, 2024).

Por outro lado, o **NLB** (azul) apresentou interações mais significativas com a região Asp187-Gln192, que está associada ao subsítio S4. Esse subsítio é conhecido por envolver resíduos que têm tanto características polares (como Gln189) quanto hidrofóbicas (como Leu167). A interação preferencial do **NLB** com essa região sugere que ele explora melhor o ambiente polar e hidrofóbico do subsítio S4, aproveitando os resíduos de Asp187 e Gln192 para interações eletrostáticas e de ligação de hidrogênio.

Ambos os ligantes compartilham interações nas regiões de His41 e Met49 (S2) e nas proximidades de His163 (S1), que são críticas para o sítio ativo da M<sup>pro</sup>. O subsítio S2, predominantemente hidrofóbico, pode estabilizar interações por meio de contatos van der Waals, enquanto o His163 do S1 facilita a formação de ligações de hidrogênio, o que é decisivo para a estabilidade do complexo ligante proteína. Apesar das diferenças nas regiões de interação mais fortes entre **PAX** e **NLB**, ambos

compartilham um padrão de ligação similar, garantindo que as interações chave com o sítio ativo da M<sup>pro</sup> sejam mantidas.

Essa análise sugere que, enquanto **PAX** tende a explorar mais as regiões polares e hidrofílicas próximas ao subsítio S1 e S1', o **NLB** se destaca nas interações em áreas hidrofóbicas e polares mistas do subsítio S4. Essa complementaridade nas interações pode refletir diferentes modos de estabilização dentro do sítio ativo da M<sup>pro</sup>, contribuindo para a efetividade potencial de cada ligante em seu contexto de ação antiviral.

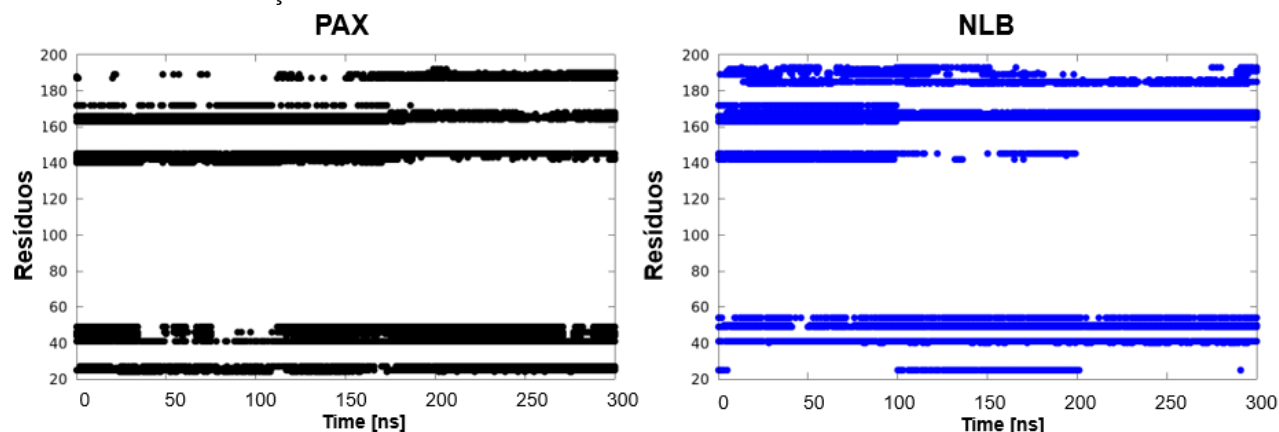


Figura 8: Gráficos de interações versus resíduos em regiões da M<sup>pro</sup> para **PAX** (preto) e **NLB** (azul) durante 300 ns de simulação de dinâmica molecular.

## CONCLUSÃO

A investigação do **NLB** como potencial inibidor da M<sup>pro</sup> do SARS-CoV-2 apresentou resultados promissores, indicando que ele pode ser uma alternativa viável para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a COVID-19. Através de abordagens integradas, como *Docking* Molecular, análises de perfil ADMET e Simulações de DM, foi possível demonstrar que o **NLB** possui interações moleculares semelhantes às do **PAX**, um fármaco aprovado para uso emergencial.

Os resultados sugerem que o **NLB**, embora precise de validação experimental, exibe um comportamento semelhante ao do **PAX** em cenários *in silico*. Estudos prévios mostraram a capacidade do **PAX** na redução de hospitalizações de pacientes de alto risco com COVID-19 leve a moderada (FDA, 2021; Lee et al., 2022). Além disso, a análise de vigilância genética reafirma a M<sup>pro</sup> como um alvo viável para intervenções terapêuticas (Shaqra et al., 2022), apoiando a ideia de que o **NLB** pode ser uma alternativa relevante, especialmente em casos de resistência ao **PAX**.

Com a crescente necessidade de estratégias terapêuticas multifacetadas, a avaliação do **NLB** como possível inibidor do M<sup>pro</sup> pode diversificar as opções de tratamento, complementando medicamentos como o **PAX** e contribuindo para o avanço no combate à COVID-19, especialmente por se tratar de um vírus com alta taxa de mutações. As referências destacam a importância do reposicionamento de fármacos (Gutti et al., 2023; Ezzat et al., 2024), e os resultados deste estudo reforçam essa abordagem, apontando o **NLB** como uma possibilidade promissora no arsenal terapêutico contra a pandemia.

## Agradecimentos

Reconhecemos o apoio do Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho (SINAPAD) e a disponibilidade de recursos computacionais fornecidos pelo Supercomputador SDumont, no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC/MCTIC), por meio do projeto qcbiocovid19, liderado pelo Professor Dr. Gerd Bruno da Rocha, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Agradecemos também ao Professor Dr. Osmair Vital de Oliveira, do Instituto Federal de São Paulo (IFSP), por suas contribuições para este trabalho. Adicionalmente, reconhecemos o apoio financeiro e computacional da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bem como os recursos fornecidos pelo Laboratório MolMod-CS. Luciano T. Costa também agradece à bolsa do CNPq (número de concessão

306032/2019–8), ao programa de pesquisa FAPERJ/APQ-1 (número de concessão E-26/210.376/2019) e ao projeto CAPES/PRINT (número de concessão 88881.310460/2018–01). Finalmente, estendemos nossa gratidão ao Colégio Militar do Rio de Janeiro, à Universidade Federal Fluminense (UFF) e ao Instituto Militar de Engenharia (IME) pelo apoio e colaboração.

### Contribuição dos Autores

Marcus Vinícius Hungaro Faria foi responsável pelo planejamento e execução de todos os experimentos, bem como pela redação do rascunho original e edição. Raphael Salles Ferreira Silva contribuiu com a execução de todos os experimentos, além da redação do rascunho original e edição. Carlos Maurício R. Sant'Anna esteve envolvido no planejamento, redação do rascunho original e edição. Luciano T. Costa esteve envolvido no planejamento, supervisão, redação do rascunho original e revisão final.

### REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Mark James *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1, p. 19-25, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>. Acesso em: 19 set. 2024.

ABRUZZESE, Elisabetta; BRECCIA, Massimo; LATAGLIATA, Roberto. Second-generation tyrosine kinase inhibitors in first-line treatment of chronic myeloid leukaemia (CML). **BioDrugs**, v. 28, p. 17-26, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40259-013-0056-z>. Acesso em: 30 jun. 2024.

AHMED, Sabbir *et al.* Molecular docking and dynamics simulation of natural compounds from betel leaves (*Piper betle* L.) for investigating the potential inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4526, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27144526>. Acesso em: 19 out. 2024.

ARBEL, Ronen *et al.* Nirmatrelvir use and severe Covid-19 outcomes during the Omicron surge. **New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 9, p. 790-798, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2204919>. Acesso em: 17 fev. 2025.

BANERJEE, Souvik *et al.* Drug repurposing to identify nilotinib as a potential SARS-CoV-2 main protease inhibitor: insights from a computational and in vitro study. **Journal of chemical information and modeling**, v. 61, n. 11, p. 5469-5483, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00524>. Acesso em: 20 de fev. 2025.

BASSANI, Davide *et al.* Re-Exploring the Ability of Common Docking Programs to Correctly Reproduce the Binding Modes of Non-Covalent Inhibitors of SARS-CoV-2 Protease Mpro. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 2, p. 180, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph15020180>. Acesso em: 30 jun. 2024.

BECKE, Axel D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 7, p. 5648–5652, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.464913>. Acesso em: 19 out. 2024.

BERENDSEN, Herman JC *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of chemical physics**, v. 81, n. 8, p. 3684-3690, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.448118>

BERENDSEN, Herman JC. Simulating the physical world. **Simulating the Physical World**, p. 540, 2004.

BERENDSEN, Herman JC; VAN DER SPOEL, David; VAN DRUNEN, Rudi. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer physics communications**, v. 91, n. 1-3, p. 43-56, 1995. DOI: [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E). Acesso em: 30 jun. 2024.

BIOVIA, Dassault Systèmes. **BIOVIA workbook**, release 2017; BIOVIA pipeline pilot, release 2017. San Diego: Dassault Systèmes, 2020. Acesso em: 19 out. 2024.

BOSKO, Jaroslav T.; TODD, B. D.; SADUS, Richard J. Molecular simulation of dendrimers and their mixtures under shear: Comparison of isothermal-isobaric (NpT) and isothermal-isochoric (NVT) ensemble systems. **The Journal of chemical physics**, v. 123, n. 3, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.1946749>. Acesso em: 30 jun. 2024.

BRECCIA, Massimo; ALIMENA, Giuliana. Nilotinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for

- chronic myeloid leukemia. **Leukemia research**, v. 34, n. 2, p. 129-134, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.08.031>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- BUSSI, Giovanni; DONADIO, Davide; PARRINELLO, Michele. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of chemical physics**, v. 126, n. 1, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.2408420>. Acesso em: 20 de jul. 2024.
- CITARELLA, Andrea *et al.* Recent Advances in SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors: From Nirmatrelvir to Future Perspectives. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1339, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13091339>. Acesso em: 27 out. 2024.
- CHEN, Nanshan *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7). Acesso em: 17 de fev. 2025.
- DE AZEVEDO, Nathalia *et al.* Desenvolvimento de um Modelo Preditivo para a Atividade Inibitória de Tiazolopiridinil-ureias sobre a Subunidade B da DNA Girase de Micobactérias por Meio de Descritores Moleculares. **Revista Virtual de Química**, 2022, 14(6): 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220056>. Acesso em: 25 de jul. 2024.
- DE OLIVEIRA, Osmair Vital *et al.* Repurposing approved drugs as inhibitors of SARS-CoV-2 S-protein from molecular modeling and virtual screening. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 11, p. 3924-3933, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1772885>. Acesso em: 20 de jul. 2024.
- DELANO, Warren L. *et al.* Pymol: An open-source molecular graphics tool. **CCP4 Newsl. Protein Crystallogr**, v. 40, n. 1, p. 82-92, 2002. Acesso em: 20 set. 2024.
- DESERNO, Markus; HOLM, Christian. How to mesh up Ewald sums. I. A theoretical and numerical comparison of various particle mesh routines. **The Journal of chemical physics**, v. 109, n. 18, p. 7678-7693, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.477414>
- DIAS, Raquel; DE AZEVEDO, Jr; WALTER, F. Molecular docking algorithms. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 1040-1047, 2008. DOI: [10.2174/138945008786949432](https://doi.org/10.2174/138945008786949432). Acesso em: 15 ago. 2024.
- ELDRIDGE, Matthew D. *et al.* Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, p. 425-445, 1997. DOI: [10.1023/A:1007996124545](https://doi.org/10.1023/A:1007996124545). Acesso em: 30 jun. 2024.
- EZZAT, Mohammed Oday; ABD RAZIK, Basma M.; SHIHAB, Wurood A. Molecular modelling and theoretical design of novel Nirmatrelvir derivatives as SARS-CoV-2 entry inhibitors. **New Materials, Compounds and Applications**, 8(2), 178-189, 2024. DOI: [10.62476/nmca82178](https://doi.org/10.62476/nmca82178). Acesso em: 11 out. 2024.
- FDA (Food and Drug Administration). (2021). **Fact sheet for healthcare providers: Emergency use authorization for Paxlovid**. Disponível em: <https://www.fda.gov/>. Acesso em: 3 set. 2024.
- FDA (Food and Drug Administration). (2023). **COVID-19 Vaccines and Treatments**. Disponível em: <https://www.fda.gov/coronavirus>. Acesso em: 17 out. 2024.
- FOCOSI, Daniele *et al.* Nirmatrelvir and COVID-19: development, pharmacokinetics, clinical efficacy, resistance, relapse, and pharmacoeconomics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 61, n. 2, p. 106708, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106708>. Acesso em: 17 fev. 2025.
- FRANÇA, Tanos CC *et al.* A complete model of the Plasmodium falciparum bifunctional enzyme dihydrofolate reductase-thymidylate synthase: a model to design new antimalarials. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, p. 450-454, 2004. DOI: [10.1590/S0103-50532004000300019](https://doi.org/10.1590/S0103-50532004000300019). Acesso em: 8 ago. 2024.
- FREITAS, Brendan T. *et al.* Characterization and noncovalent inhibition of the deubiquitinase and deISGylase activity of SARS-CoV-2 papain-like protease. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 8, p. 2099-2109, 2020. DOI: [10.1021/acsinfecdis.0c00168](https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00168). Acesso em: 16 out. 2024.
- FUHRMANS, Marc *et al.* Effects of bundling on the properties of the SPC water model. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 125, p. 335-344, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00214-009-0590-4>. Acesso em: 15 de jun. 2024.

GEHLHAAR, Daniel K. *et al.* Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. **Chemistry & Biology**, v. 2, n. 5, p. 317-324, 1995. Acesso em: 25 jul. 2024.

GUEx, Nicolas; PEITSCH, Manuel C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997. DOI: 10.1002/elps.1150181505. Acesso em: 29 set. 2024.

GUTTI, Gopichand *et al.* In-silico guided design, screening, and molecular dynamic simulation studies for the identification of potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors for the targeted treatment of COVID-19. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 42, n. 4, p. 1733-1750, 2024. DOI: 10.1080/07391102.2023.2202247. Acesso em: 2 out. 2024.

HANWELL, Marcus D. *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, p. 1-17, 2012.

HEHRE, Warren J.; DITCHFIELD, Robert; POPLE, John A. Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of Gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 56, n. 5, p. 2257-2261, 1972. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.1677527>. Acesso em: 19 out. 2024.

HESS, Berk *et al.* GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of chemical theory and computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/ct700301q>. Acesso em: 30 jun. 2024.

JIN, Zhenming *et al.* Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289-293, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>. Acesso em: 10 de out. 2024.

JONES, Gareth *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>. Acesso em: 12 de set. 2024.

JORGENSEN, William L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926-935, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.445869>. Acesso em: 17 de out. 2024.

KANDWAL, Shubhangi; FAYNE, Darren. Genetic conservation across SARS-CoV-2 non-structural proteins–Insights into possible targets for treatment of future viral outbreaks. **Virology**, v. 581, p. 97-115, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.02.011>. Acesso em: 17 de fev. 2025.

KHURANA, Varun *et al.* Inhibition of OATP-1B1 and OATP-1B3 by tyrosine kinase inhibitors. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 29, n. 4, p. 249-259, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1515/dmd-2014-0014>. Acesso em: 14 de ago. 2024.

KHURANA, Varun *et al.* Role of OATP-1B1 and/or OATP-1B3 in hepatic disposition of tyrosine kinase inhibitors. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 29, n. 3, p. 179-190, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1515/dmd-2013-0062>. Acesso em: 10 de jul. 2024.

KINCAID, Joseph RA *et al.* A sustainable synthesis of the SARS-CoV-2 Mpro inhibitor nirmatrelvir, the active ingredient in Paxlovid. **Communications Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 156, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42004-022-00758-5>. Acesso em: 11 de ago. 2024.

KOULGI, Shruti *et al.* Drug repurposing studies targeting SARS-CoV-2: an ensemble docking approach on drug target 3C-like protease (3CLpro). **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 15, p. 5735-5755, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1792344>. Acesso em: 13 de set. 2024.

LASKOWSKI, Roman A. *et al.* PDBsum: Structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 129-134, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.3289>. Acesso em: 17 de out. 2024.

LEE, Chengteh; YANG, Weitao; PARR, Robert G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 37, n. 2, p. 785, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.37.785>. Acesso em: 19 out. 2024.

LEE, Jonathan T. *et al.* Genetic surveillance of SARS-CoV-2 Mpro reveals high sequence and structural conservation prior to the introduction of protease inhibitor Paxlovid. **Mbio**, v. 13, n. 4, p. e00869-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00869-22>. Acesso em: 12 de set. 2024.

LEMKUL, J. A. Introductory tutorials for simulating protein dynamics with GROMACS. **The Journal of Physical Chemistry B**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.4c04901>. Acesso em: 19 out. 2024.

LI, Qun *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199-1207, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1056%2FNEJMoa2001316>. Acesso em: 15 de jun. 2024.

LIPINSKI, Christopher A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4-17, 2012. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0). Acesso em: 10 de out. 2024.

LOSCHWITZ, Jennifer *et al.* Novel inhibitors of the main protease enzyme of SARS-CoV-2 identified via molecular dynamics simulation-guided in vitro assay. **Bioorganic Chemistry**, v. 111, p. 104862, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104862>. Acesso em: 20 de fev. 2025.

LIU, Cynthia *et al.* Research and development on therapeutic agents and vaccines for COVID-19 and related human coronavirus diseases. 2020. **ACS pharmacology & translational science**, 3(5), 813-834. DOI: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00272>. Acesso em: 10 de jul. 2024.

LIU, Nanxin *et al.* Identification of a Putative SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitor through In Silico Screening of Self-Designed Molecular Library. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 14, p. 11390, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241411390>. Acesso em: 20 de fev. 2025.

LIU, Xiaodong. Transporter-mediated drug-drug interactions and their significance. In: **Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity**, p. 241-291, 2019. Acesso em: 17 de out. 2024.

LU, Roujian *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8). Acesso em: 17 de fev. 2025.

MACKERELL JR, Alexander D.; BANAVALI, Nilesh; FOLOPPE, Nicolas. Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids. **Biopolymers: Original Research on Biomolecules**, v. 56, n. 4, p. 257-265, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)56:4%3C257::AID-BIP10029%3E3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)56:4%3C257::AID-BIP10029%3E3.0.CO;2-W). Acesso em: 15 de jun. 2024.

MAHASE, Elisabeth. Covid-19: Pfizer's Paxlovid is 89% effective in patients at risk of serious illness, company reports. **BMJ**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n2713>. Acesso em: 12 de set. 2024.

MANLEY, Paul W. *et al.* Extended kinase profile and properties of the protein kinase inhibitor nilotinib. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 3, p. 445-453, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.008>. Acesso em: 14 de ago. 2024.

MESECAR, A. D. *et al.* A taxonomically-driven approach to development of potent, broad-spectrum inhibitors of coronavirus main protease including SARS-CoV-2 (COVID-19). **Be Publ**, v. 10, 2020. DOI: <http://doi.org/10.2210/pdb6w63/pdb>. Acesso em: 10 de jul. 2024.

MOLAVI, Zahra *et al.* Identification of FDA approved drugs against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro), drug repurposing approach. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111544, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111544>. Acesso em: 20 de fev. 2025.

MOOIJ, Wijnand TM; VERDONK, Marcel L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 61, n. 2, p. 272-287, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/prot.20588>. Acesso em: 11 de ago. 2024.

MORSE, Philip McCord; FESHBACH, Herman. **Methods of theoretical physics**. Technology Press, 1946.

NAIK, Vankudavath Raju *et al.* Remdesivir (GS-5734) as a therapeutic option of 2019-nCoV main protease-in silico approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 13, p. 4701-4714, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1781694>. Acesso em: 15 de jun. 2024.

NEESE, F. ORCA—an Ab Initio, DFT and Semiempirical SCF-MO Package. D-45470 Mülheim/Ruhr: **Max Planck Institute for Bioinorganic Chemistry**. Version 4.2.1, 2010. Acesso em: 17 de out. 2024.

NEESE, Frank. Software update: the ORCA program system, version 4.0. **Wiley Interdisciplinary**

**Reviews: Computational Molecular Science**, v. 8, n. 1, p. e1327, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.1327>. Acesso em: 30 jun. 2024.

NGUYEN, Hoang Linh *et al.* 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**, v. 124, n. 50, p. 11337-11348, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07312>. Acesso em: 10 de out. 2024.

NOVAK, Jurica *et al.* Proposition of a new allosteric binding site for potential SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors by utilizing molecular dynamics simulations and ensemble docking. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, n. 19, p. 9347-9360, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1927845>. Acesso em: 20 de fev. 2025.

NOVICK, Paul A. *et al.* SWEETLEAD: an in silico database of approved drugs, regulated chemicals, and herbal isolates for computer-aided drug discovery. **PloS One**, v. 8, n. 11, p. e79568, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079568>. Acesso em: 12 de set. 2024.

OH, Kwang Jin; DENG, Yuefan. An efficient parallel implementation of the smooth particle mesh Ewald method for molecular dynamics simulations. **Computer Physics Communications**, v. 177, n. 5, p. 426-431, 2007. DOI: 10.1016/j.cpc.2007.05.005. Acesso em: 12 jul. 2024.

PICCIRILLO, Erika; AMARAL, Antonia Tavares do. Virtual screening of bioactive compounds: concepts and applications. **Química Nova**, v. 41, p. 662-677, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170210>. Acesso em: 14 de ago. 2024.

PRONK, Sander *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845-854, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055>. Acesso em: 15 de jun. 2024.

QIAO, Zhen *et al.* The Mpro structure-based modifications of ebsele derivatives for improved antiviral activity against SARS-CoV-2 virus. **Bioorganic Chemistry**, v. 117, p. 105455, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105455>. Acesso em: 30 jun. 2024.

RIZZO-VALENTE, V. S.; OLIVEIRA, J. S.; VIZZONI, V. F. XEC: international spread of a new sublineage of Omicron SARS-CoV-2. **Authorea Preprints**, 2024. DOI: 10.22541/au.172873324.41905753/v1. Acesso em: 10 de jul. 2024.

ROCHA, Gerd B. *et al.* Rm1: A reparameterization of am1 for h, c, n, o, p, s, f, cl, br, and i. **Journal of Computational Chemistry**, 2006, 27(10): 1101-1111. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20425>. Acesso em: 12 de jul. 2024.

SANTOS, Samuel JM; VALENTINI, Antoninho. In silico investigation of Komaroviquinone as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Molecular docking, molecular dynamics, and QM/MM approaches. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 2024, 126: 108662. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2023.108662>. Acesso em: 15 de jul. 2024.

SCHWEDE, Torsten *et al.* SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, 2003, 31(13): 3381-3385. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>. Acesso em: 20 de jul. 2024.

SHAQRA, Ala M. *et al.* Defining the substrate envelope of SARS-CoV-2 main protease to predict and avoid drug resistance. **Nature Communications**, 2022, 13(1): 3556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31210-w>. Acesso em: 25 de jul. 2024.

SHRESTHA, Sundar S. *et al.* Estimation of coronavirus disease 2019 hospitalization costs from a large electronic administrative discharge database, March 2020–July 2021. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2021. p. ofab561. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab561>. Acesso em: 17 de fev. 2025.

SILVA, Raphael SF *et al.* In silico studies of semi-synthetic benzo [a] phenazines as inhibitors of dihydrofolate reductase from Plasmodium falciparum. **Journal of Molecular Structure**, v. 1237, p. 130404, 2021.

SILVA, Raphael SF *et al.* In silico study of the interaction of phenazines with tuberculostatic activity with known molecular targets of Mycobacterium tuberculosis. **Results in Chemistry**, v. 6, p. 101094, 2023.

SILVA, Raphael SF *et al.* INVESTIGATING CHOLAGOGUE AND CHOLERETIC ACTIVITY OF PEUMUS

- BOLDUS. **Química Nova**, v. 48, n. 3, p. e-20250091, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20250091>. Acesso em: 17 de fev. 2025.
- SMITH, J. *et al.* Guidelines for Second-Line Therapies in Clinical Practice. **Journal of Clinical Medicine**, 2023, 12(1): 100-110. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm12010001>. Acesso em: 1 de ago. 2024.
- SOUZA DA SILVA, Alan W.; VRANKEN, Wim F. ACPYPE-Antechamber python parser interface. **BMC Research Notes**, 2012, 5: 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>. Acesso em: 5 de ago. 2024.
- SUN, Le-Yun *et al.* Ebsulfur and Ebselen as highly potent scaffolds for the development of potential SARS-CoV-2 antivirals. **Bioorganic Chemistry**, v. 112, p. 104889, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104889>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- VAN DER SPOEL, David *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, 2005, 26(16): 1701-1718. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>. Acesso em: 10 de ago. 2024.
- VARDHAN, Seshu; SAHOO, Suban K. In silico ADMET and molecular docking study on searching potential inhibitors from limonoids and triterpenoids for COVID-19. **Computers in Biology and Medicine**, 2020, 124: 103936. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2020.103936>. Acesso em: 15 de ago. 2024.
- WANG, Fenghua *et al.* Structure of main protease from human coronavirus NL63: insights for wide spectrum anti-coronavirus drug design. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 22677, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep22677>. Acesso em: 20 de ago. 2024.
- WANG, Q. *et al.* Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 894-904.e9, 14 maio 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>. Epub em: 9 abr. 2020. PMID: 32275855; PMCID: PMC7144619. Acesso em: 20 out. 2024.
- WEIGEND, Florian; AHLRICHS, Reinhart. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 7, n. 18, p. 3297-3305, 2005. Acesso em: 19 out. 2024.
- WELLINGTON, K. W. Understanding cancer and the anticancer activities of naphthoquinones – a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 26, p. 20309-20338, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4RA13547D>. Acesso em: 19 out. 2024.
- WHO (World Health Organization). **COVID-19 Weekly Epidemiological Update**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---20-september-2023>. Acesso em: 25 de set. 2024.
- WHO (World Health Organization). **Tracking SARS-CoV-2 variants**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em: 17 de out. 2024.
- WU, Fan *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, 2020, 579(7798): 265-269. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>. Acesso em: 30 de out. 2024.
- XUE, Xiaoyu *et al.* Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design. **Journal of Virology**, 2008, 82(5): 2515-2527. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02114-07>. Acesso em: 5 de nov. 2024.
- YAGHI, Rasha M. *et al.* An Investigation of Nirmatrelvir (Paxlovid) Resistance in SARS-CoV-2 Mpro. **ACS Bio & Med Chem Au**, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsbiomedchemau.4c00045>. Acesso em: 10 de nov. 2024.
- ZHANG, Deng-hai *et al.* In silico screening of Chinese herbal medicines with the potential to directly inhibit 2019 novel coronavirus. **Journal of Integrative Medicine**, 2020, 18(2): 152-158. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joim.2020.02.005>. Acesso em: 15 de nov. 2024.
- ZHANG, Linlin *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. **Science**, 2020, 368(6489): 409-412. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>. Acesso em: 20 de nov. 2024.
- ZHOU, Peng *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, 2020, 579(7798): 270-273. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>. Acesso em: 25

de nov. 2024.

ZHOU, Shilin *et al.* SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 159, p. 114242, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114242>. Acesso em: 22 de fev. 2025.

ZHU, Na *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, 2020, 382(8): 727-733. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>. Acesso em: 30 de nov. 2024