

Estudo *in silico* de fitoquímicos na região *Receptor-Binding Domain* (RBD) da proteína *spike* do SARS-CoV-2 (variante Ômicron, B.1.1.529)

***In silico* study of phytochemicals in the Receptor-Binding Domain (RBD) region of the SARS-CoV-2 spike protein (Omicron variant, B.1.1.529)**

Estudio *in silico* de fitoquímicos en la región del *Receptor-Binding Domain* (RBD) de la proteína *spike* del SARS-CoV-2 (variante Omicron, B.1.1.529)

Recebido: 19/07/2022 | Revisado: 26/07/2022 | Aceito: 27/07/2022 | Publicado: 05/08/2022

Helyson Lucas Bezerra Braz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1996-8831>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: helysonlucas@alu.ufc.br

Fernanda Martins de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9072-2258>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: fernandamartins@alu.ufc.br

João Junior Faustino Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4727-2962>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: juniorfaustino@alu.ufc.br

Renata de Sousa Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0630-1499>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: renata.alves@ufc.br

Roberta Jeane Bezerra Jorge

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2703-4302>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: robertajeane@ufc.br

Gilberto Santos Cerqueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6717-3772>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: cerqueira@ufc.br

Resumo

COVID-19 é uma doença altamente contagiosa causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) tornando-se uma grande ameaça em todo o mundo devido à sua rápida natureza de disseminação e variantes mais agressivas, como o caso da Ômicron. A principal estrutura de interação do vírus com a célula hospedeira é a região de pico da proteína Spike chamada de RBD, uma estrutura que teve diversas mutações, dificultando a busca de fármacos. Com base nesse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de interações entre moléculas de origem naturais frente a região RBD da proteína Spike (S) do SARS-CoV-2, variante Ômicron. Na primeira etapa metodológica ocorreu uma modelagem molecular da estrutura RBD de sequência obtida no Brasil e testes para sua caracterização e validação estrutural. Em seguida, foi realizado o docking molecular entre 6 ligantes fitoquímicos: Curcumina, Carvacrol (\pm)-Limoneno, Glicirrizina, Alicina e Quercetina-3-Arabinoside na região específica RBD modelada, após obter os melhores resultados, os complexos formados foram avaliados por RMSD e RMSF. Na homologia da região RBD obteve-se uma estrutura com baixos erros estruturais. Nas interações de cada fitoquímico, as moléculas glicirrizina e quercetina apresentaram maior afinidade molecular, ligando-se ao sítio ativo encontrado na RBD. A dinâmica molecular confirmou a interação dos ligantes e a estabilidade dos complexos durante as simulações. A quercetina e glicirrizina apresentaram um potencial molécula ligando-se à região RBD da proteína S, a partir do genoma da variante ômicron inédita do SARS-CoV-2 sequenciada no Brasil.

Palavras-chave: COVID-19; Docking molecular; Moléculas naturais.

Abstract

COVID-19 is a highly contagious disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) becoming a major threat worldwide due to its fast-spreading nature and more aggressive variants, such as the case of Omicron. The main interaction structure of the virus with the host cell is the spike region of the Spike protein called RBD, a structure that has had several mutations, making the search for drugs difficult. Based on this scenario,

the present work aimed to evaluate the profile of interactions between molecules of natural origin against the RBD region of the Spike (S) protein of SARS-CoV-2, Ômicron variant. In the first methodological step, there was a molecular modeling of the RBD structure of a sequence obtained in Brazil and tests for its characterization and structural validation. Then, molecular docking was performed between 6 phytochemical ligands: Curcumin, Carvacrol (\pm)-Limonene, Glycyrrhizin, Allicin and Quercetin-3-Arabinoside in the specific region modeled RBD, after obtaining the best results, the complexes formed were evaluated by RMSD and RMSF. In the homology of the RBD region, a structure with low structural errors was obtained. In the interactions of each phytochemical, the molecules glycyrrhizin and quercetin showed higher molecular affinity, binding to the active site found in RBD. Molecular dynamics confirmed the interaction of ligands and the stability of the complexes during the simulations. Quercetin and glycyrrhizin showed a potential molecule binding to the RBD region of protein S, from the genome of the unprecedented omicron variant of SARS-CoV-2 sequenced in Brazil.

Keywords: COVID-19; Molecular docking; Natural molecules.

Resumen

El COVID-19 es una enfermedad altamente contagiosa causada por el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) convirtiéndose en una gran amenaza a nivel mundial debido a su rápida propagación y variantes más agresivas, como es el caso de Omicron. La principal estructura de interacción del virus con la célula huésped es la región de la espiga de la proteína Spike llamada RBD, una estructura que ha tenido varias mutaciones, lo que dificulta la búsqueda de fármacos. Con base en este escenario, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el perfil de interacciones entre moléculas de origen natural contra la región RBD de la proteína Spike (S) del SARS-CoV-2, variante Ômicron. En el primer paso metodológico, hubo un modelado molecular de la estructura RBD de una secuencia obtenida en Brasil y pruebas para su caracterización y validación estructural. Luego, se realizó acoplamiento molecular entre 6 ligandos fitoquímicos: Curcumina, Carvacrol (\pm)-Limoneno, Glicirricina, Alicina y Quercetina-3-Arabinósido en la región específica modelada RBD, luego de obtener los mejores resultados, los complejos formados fueron evaluados por RMSD y RMSF. En la homología de la región RBD se obtuvo una estructura con bajos errores estructurales. En las interacciones de cada fitoquímico, las moléculas glicirricina y quercetina mostraron mayor afinidad molecular, uniéndose al sitio activo que se encuentra en RBD. La dinámica molecular confirmó la interacción de los ligandos y la estabilidad de los complejos durante las simulaciones. La quercetina y la glicirricina mostraron una molécula potencial que se une a la región RBD de la proteína S, del genoma de la variante omicron sin precedentes del SARS-CoV-2 secuenciada en Brasil.

Palabras clave: COVID-19; Docking molecular; Moléculas naturales.

1. Introdução

COVID-19 é uma doença altamente contagiosa causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) que surgiu pela primeira vez em Wuhan, China, tornando-se uma grande ameaça em todo o mundo devido à sua natureza de rápida disseminação (Chen et al., 2020). Até dezembro de 2019 se conheciam 6 tipos de vírus da família coronavírus capazes de causar doenças no humano, destes, quatro são prevalentes e causam sintomas típicos de resfriados (229E, OC43, NL63, HKU1). Os outros 2 tipos, síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) são mais agressivos, afetando o trato respiratório inferior e levando a consequências e sintomas mais graves (Chen, 2020; Adhikari et al., 2020).

As infecções por SARS-CoV-2 atingiram em pouco tempo milhões de pessoas em todo o mundo, com predomínio na Europa e na América do Norte. (Hui et al., 2020). Os principais sintomas apresentados pelos pacientes infectados são: febre, dor de cabeça, dor de garganta tosse, dores musculares e falta de ar, podendo incluir também conjuntivite, diarreia, vômito e dor abdominal, também foram relatados sintomas menos comuns como a perda do olfato ou sua diminuição e perda do sentido do paladar (Iser et al., 2020; Yang et al.2020).

Os coronavírus são vírus envelopados de RNA positivo, as principais diferenças dentro da família são encontradas no número, tipo e tamanho de proteínas estruturais, que produzem alterações significativas na estrutura e morfologia do vírus. (Huang et al 2019). O vírus SARS-CoV-2 tem aparência de uma coroa solar, por isso o nome coronavírus. Esta partícula viral tem uma morfologia esférica com diâmetro entre 60 a 140 nm juntamente com picos (*Spikes*) de aproximadamente 8 a 12 nm de comprimento (Zheng, 2020).

Sua estrutura é formada principalmente por um nucleocapsídeo na qual protege o material genético viral e um

envelope externo. Existem quatro proteínas estruturais principais, conhecidas como proteínas S (*spike*), E (envelope), M (membrana) e N (nucleocapsídeo). Entre as funções das principais proteínas estruturais estão: a proteína (S) permite a entrada do vírus na célula hospedeira pela ligação ao receptor celular e à fusão da membrana, facilitando a fixação do vírus ao receptor da célula hospedeira, a proteína (M) ajuda a manter a curvatura da membrana e a ligação ao nucleocapsídeo, a (E) desempenha um papel importante na montagem e liberação do vírus e a proteína (N) faz parte do nucleocapsídeo por ligação ao material genético viral (Jaiswal; Kumar, 2020; LI et al., 2020)

A replicação do SARS-CoV-2, segue o modelo padrão de replicação da família *Coronaviridae*, com algumas particularidades. Primeiro ocorre a ligação do vírus através da ligação da proteína Spike (S), localizada no envelope viral, com o receptor de Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) localizado na membrana plasmática da célula-alvo, iniciando a etapa de adesão. Para que o vírus possa entrar na célula hospedeira, é necessário a ativação da proteína S pela protease celular Transmembranar Serina 2 (TMPRSS2) que irá clivar esta proteína permitindo assim a entrada do vírus na célula por endocitose (Favalli et al., 2020; Hoffmann et al, 2020).

A seguir, ocorre a fusão entre o envelope viral com a membrana do endossomo, em um ambiente acidificado, etapa de desnudamento, havendo a liberação do genoma viral no citoplasma da célula-alvo. Por apresentar como genoma um RNA de fita simples e polaridade positiva, esse vírus pode ser imediatamente traduzido a nível dos ribossomos da célula hospedeira. A tradução inicial do RNA viral, mediante a extremidade 5', onde estão codificadas as ORF 1a e ORF 1b dará origem há duas poliproteínas denominadas pp1a e pp1b, que contém 16 NSP (16 proteínas não estruturais), elas desempenham um papel essencial na replicação do vírus dentro das células hospedeiras e alguns deles são alvo de várias drogas em desenvolvimento (Cabanillas et al., 2021; Rabaan et al., 2020).

Outras ORFs, localizadas na extremidade 3', codificam as proteínas estruturais (N, M, E e S). A formação dos vírions maduros ocorre a interação com as proteínas S, E e M na formação da partícula completa no compartimento intermediário retículo endoplasmático de Golgi. Ao final da montagem e aquisição do envelope viral, os vírus se acumulam em vesículas e concluem a maturação. Os vírus são transportados através de vesículas para a superfície celular, sendo liberados por exocitose (Hartenian et al, 2020; Srinivasan et al., 2020; Wu et al 2020).

O surgimento contínuo de várias variantes e mutantes do SARS-CoV-2 de tempos em tempos levou ao aumento da morbidade e mortalidade em meio a diferentes ondas de pandemia dentro da pandemia em andamento, resultando em altas preocupações e pânico com a saúde global (Boehm et al., 2021; Thakur et al., 2021). Após as variantes *Alpha*, *Beta*, *Gamma* e *Delta* SARS-CoV-2, a variante Ômicron (B.1.1.529) surgiu recentemente durante novembro de 2021 como uma variante de vírus altamente mutada, classificada como VOC pela OMS em 26 de novembro de 2021, que agora é alcançando posição de cepa dominante em vários países devido à sua alta transmissibilidade (Who, 2021). A variante Ômicron contém pelo menos 30 mutações na proteína *spike* em relação a estrutura original de Wuhan (Kupferschmidt & Vogel, 2021), essas mutações podem afetar a transmissibilidade do Ômicron e tornarão a variante mais infecciosa (Khandian et al., 2022).

A utilização de fármacos resultantes de produtos naturais, vem sendo utilizado por seres humanos há muito tempo como alternativa para tratamento de diversas patologias, o Brasil dispõe de inúmeras espécies vegetais com propriedades bioativas, o bioma brasileiro oferta a matéria-prima necessária para o desenvolvimento de fármacos a parte de folhas, raízes e frutos (Marinho et al., 2022).

Com o surgimento da COVID-19, tornou-se necessário a busca de novas substâncias que apresentem capacidade antiviral contra o SARS-CoV-2. Perante estes fatos, diversas pesquisas clínicas utilizaram o sistema de reaproveitamento de fármacos que já existem, diante a situação de emergência vivenciada tornou-se necessário a busca rápida de um novo modelo terapêutico eficaz. Esse acontecimento dá oportunidade para realização de tratamentos alternativos tendo como destaque a utilização de plantas medicinais (Silva-Neto et al., 2021).

Como é amplamente conhecido que pequenas moléculas, particularmente produtos naturais, compartilham uma parte significativa dos medicamentos disponíveis comercialmente (Christy et al., 2020). A maioria desses medicamentos é comercializada como antiviral ou para uso em outras infecções (Osmanov et al., 2020). Além disso, foi estabelecido que o SARS-CoV-2 compartilha aproximadamente 79,5% de semelhança genômica com o SARS-CoV e 50% de semelhança com o MERS-CoV (Zhu et al., 2020). Poucos exemplos relevantes de pandemias anteriores incluem o uso de *Allium porrum* (Alliaceae), tabaco *Nicotiana tobacco* (Solanaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae), *Hippeastrum hybrid* (Amaryllis), etc., contra SARS-CoV e derivados de kaempferol (*Viola odorata* L), galato de epigalocatequina, galato de galocatequina, quercetina-3- β -d-glicosídeo, isobavachalcole, herbacetina e helicrissetina com potencial contra MERS-CoV (Christy et al., 2020). Portanto, medicamentos a partir de produtos naturais relacionados com efeitos promissores contra as pandemias anteriores também podem ser reaproveitados na pandemia atual.

Muitos estudos estão em andamento para identificar moléculas naturalmente derivadas contra os principais alvos farmacológicos do SARS-CoV-2 usando metodologias de triagem virtual, docking molecular e dinâmica molecular. Esta abordagem acelera a descoberta de drogas e leva à identificação de moléculas semissintéticas que podem ser úteis para os ensaios in silico. Assim, consideramos que moléculas de produtos naturais que foram eficazes contra o vírus da mesma família do SARS-CoV-2 podem ser úteis em variantes da pandemia atual, agindo pela proteína estrutural mutante, a proteína S (variante ômicron). O alvo selecionado para esse estudo foi a região de interação principal do vírus *receptor-binding domain* (RBD) da proteína *spike* da variante Ômicron (B.1.1.529), tendo como objetivo realizar uma triagem virtual de substâncias naturais que apresentem capacidade antiviral contra o SARS-CoV-2.

2. Metodologia

As simulações foram realizadas em dois computadores desktop com hardwares semelhantes com processador Intel Core i9-10900 - 2.8GHz, 16GB de memória RAM e GPU RTX 3060 Ti e sistema operacional diferentes, um computador dedicado a análises farmacocinética e farmacodinâmica e outro, dedicado a análises de dinâmica molecular.

2.1 Homologia de proteínas

A modelagem de homologia é amplamente aplicada para criar uma estrutura de proteína confiável usando sua própria sequência de aminoácidos (Elmezayen et al., 2020). A sequência completa do genoma da variante ômicron do SARS-CoV-2 (ON241705.1) foi encontrada no banco de nucleotídeos do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O servidor web SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) foi usado para construir o modelo RBD da proteína SARS-CoV-2 S (Biasini et al., 2014).

A estrutura obtida (PDB ID: 6W41) foi utilizada como modelo que apresentou 99,62% de similaridade com a sequência RBD. A estrutura do 6W41 foi obtida experimentalmente por difração de raios X (XRD) com resolução de 3,08 Å no PDB (<https://www.rcsb.org/>). Após a obtenção do modelo RBD, o servidor de análise e verificação de estruturas (SAVES v6.0) da Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA) foi utilizado para avaliar a qualidade estrutural (Elfiky, 2020). Os softwares utilizados para verificar a validade do modelo foram o PROCHECK (Laskowski et al., 1996), Verify 3D (Eisenberg et al., 1997), PROVE (Pontius et al., 1996) e ERRAT (Hooft et al., 1996). Após a validação do modelo, a minimização estrutural foi realizada no software UCSF CHIMERA v1.14 utilizando o campo de força AMBER ff14SB (Maier et al., 2015) e PROSA (Wiederstein et al., 2007).

2.2 Preparação dos ligantes

ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) é um banco de dados químico que oferece acesso rápido a mais de 67

milhões de informações químicas baseadas em estrutura (Pence & Willians, 2010). Os ligantes Curcumina (CSID: 839564), Carvacrol (CSID: 21105867), (\pm)-Limoneno (CSID: 20939), Glicirrizina (CSID: 14263), Alicina (CSID: 58548), Quercetin-3-Arabinoside (CSID: 16736526) foram obtidos a partir deste repositório virtual. Todas as estruturas foram otimizadas usando o software Avogadro 1.2.0, pré-calculadas com campo de força usando o tipo MMFF94 e otimizadas geometricamente usando o método *Functional Density Theory* (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G (d) presente no pacote GAMESS (Barca et al., 2020; Khaerunnisa et al., 2020).

2.3 Ancoragem molecular

Bolsões e cavidades da proteína obtida foram detectados através do servidor WEB CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html>) com uma sonda de raio de 1,4 Å (valor padrão) para verificando possíveis sítios ativos na estrutura (Tian et al., 2018). O software AutoDock Vina e o AutoDock Tools foram utilizados em todos os experimentos de docking (Trott & Olson, 2010). No AutoDock Tools, a água e outros resíduos presentes na estrutura que não eram críticos para o estudo foram removidos e, em seguida, um grupo polar hidrogênio foi adicionado para estabelecer conexões entre a macromolécula e o ligante testado. A caixa Grid foi gerada com as coordenadas X = -41,250, Y = -37,258 e Z = -5,275 e o tamanho da caixa foi X = 80, Y = 80 e Z = 80. A capacidade de ligação dos ligantes testados e seus as pontuações de afinidade de ligação correspondentes (ΔG) foram usadas para determinar melhores interações moleculares, aceitando $\Delta G \leq -6,0$ kcal/mol. A visualização da ligação das estruturas foi observada por Pymol v2.0 (Schrodinger, 2021) e LigPlot+ v2.2 (Laskowski & Swindells, 2011) nos formatos 3D e 2D.

2.4 Simulação por Dinâmica Molecular

Todas as simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas pelo *GRO*ningen *MACH*ine for *CHEM*ical *SIM*ulations (GROMACS) versão 5.1.2 (Abraham et al., 2015). O campo de força OPLS-AA/L e o modelo de água TIP3P embutido no GROMACS foram usados para todas as simulações de MD (Kaminski et al., 2001). O arquivo de topologia das proteínas foi preparado pelo GROMACS, enquanto a topologia dos ligantes foi obtido do LigParGen (Dodda et al., 2017). A fim de satisfazer as convenções mínimas de imagem, o sistema foi inicialmente acomodado em uma caixa cúbica com uma distância de 2 nm entre o complexo proteico e a caixa. Todos os comprimentos de ligação de proteínas e ligantes foram restringidos usando o algoritmo LINCS enquanto as moléculas de água foram restringidas pelo algoritmo SETTLE (Hess et al., 1997; Miyamoto & Kollman, 1992). Um total de 30.000 moléculas de água foram adicionados a uma caixa de simulação cúbica contendo a estrutura da RBD-*Omicron* não ligados, respectivamente. Cada sistema foi minimizado em energia usando o algoritmo *descent* mais íngreme e equilibrado para atingir o volume apropriado. As interações sem ligações de curto e longo alcance foram calculadas pela aplicação de pontos de corte de alcance duplo de 0,9 e 1,4 nm, respectivamente. O *leap frog algorithm* com passo de tempo 2 fs foi usado para integrar a equação de movimento e a lista de *neighbor* foi atualizada a cada cinco passos. A eletrostática de longo alcance é tratada usando o método *Particle Mesh* Ewald, com um espaçamento de grade de Fourier de 0,15 (Darden et al., 1993). Condições de contorno periódicas foram aplicadas em todas as três direções. O equilíbrio dos sistemas foi realizado em duas etapas principais. Primeiro, o sistema foi aquecido gradualmente até 300 K no conjunto NVT usando o algoritmo *v-rescale* por 10 ns. Em seguida, o conjunto NPT foi usado por 5 ns restringindo os complexos (ligantes/proteínas) enquanto lentamente permitia que as moléculas do solvente relaxassem em torno dele e, finalmente, outro equilíbrio de NPT de 10 ns foi realizado, removendo as restrições sobre os complexos. Para todos os sistemas, os valores médios de temperatura e pressão permaneceram próximos aos valores desejados. Os sistemas equilibrados foram então submetidos a simulações de MD de produção irrestrita de 100 ns cada, mantendo a pressão alvo (1 bar) e a temperatura (300 K). A reprodutibilidade dos resultados foi verificada por duas diferentes simulações repetidas com diferentes

velocidades iniciais e tempos de equilíbrio. As tendências gerais no RMSD e RMSF foram calculados a partir das simulações de MD (Ghosh et al., 2021).

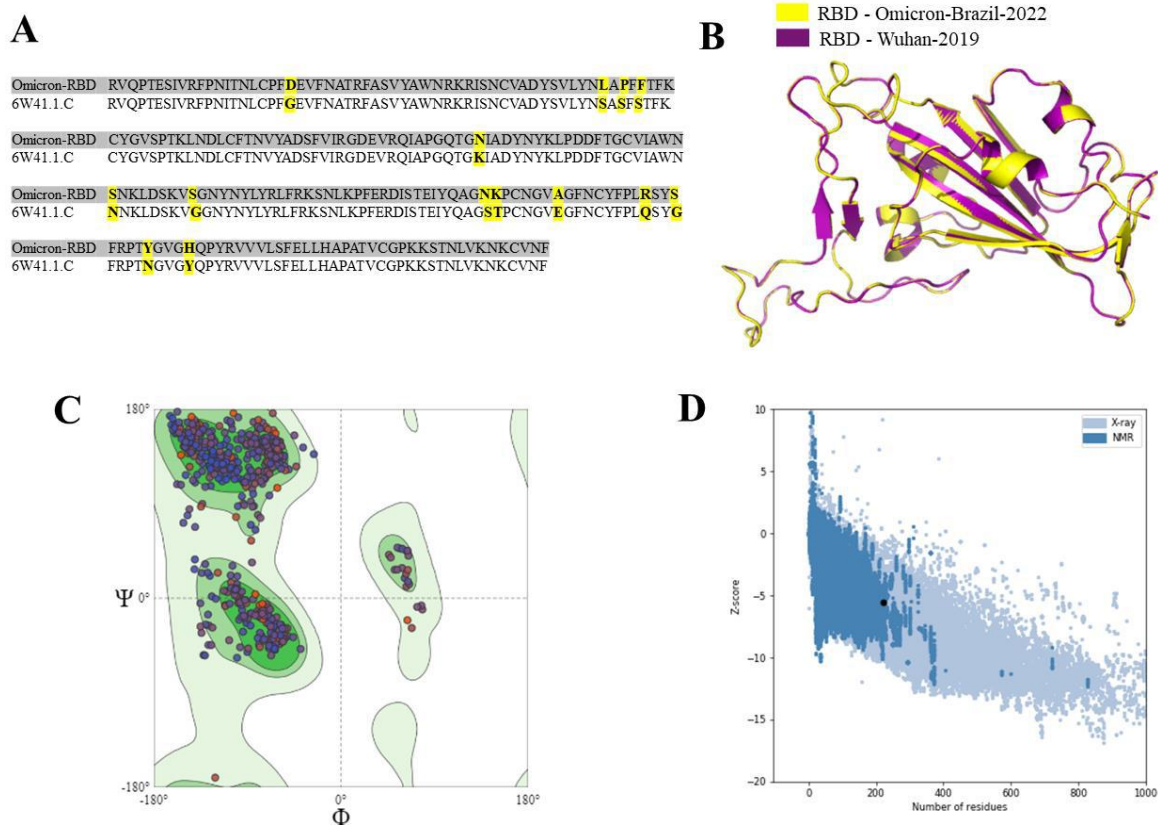
3. Resultados e Discussão

Com base na identidade de sequência entre o SARS-CoV-2 e o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína Spike, o software SWISS-MODEL construiu um modelo válido e de alta qualidade com um total de 223 aminoácidos e com 94,85% de similaridade em relação a estrutura RBD da sequência original do SARS-CoV-2 (6W41).

As regiões correspondentes no genoma do SARS-CoV-2 foram identificadas com base na identidade da sequência e na pontuação de similaridade. A Figura 1A mostra a comparação dos aminoácidos da RBD homóloga e a estrutura 6W41, as marcações em amarelo na figura indicam as 14 mutações ocorridas em comparação ao modelo da cepa original de Wuhan-2019. Com um resultado de alta similaridade de sequência, os modelos de homologia revelaram uma arquitetura geral surpreendentemente conservada e sobreposição de ambas no plano tridimensional (Figura 1B). A sobreposição de RBD com a proteína RBD (6W41) SARS-CoV-2 demonstrou alta similaridade estrutural, com valores de desvio quadrado médio (RMSD) de 0,35Å. Além disso, o valor médio do classificador QMEANDisCo (Studer et al., 2020) Global foi de 0.83 ± 0.05 , valor com baixos erros estruturais, além disso os resultados confirmaram a maior qualidade do modelo, onde a pontuação padrão varia de 0 a 1 (Benkert et al., 2008).

Em seguida, a estrutura modelada foi validada através das análises PROCHECK, Verify 3D e PROSA II. A análise do PROCHECK previu que o modelo hipotético obteve 88,6% de resíduos na região favorecida; enquanto 9,1% são residuais na região adicional permitida, 2,2% nas regiões generosamente permitidas e 0% nas regiões não permitidas. O fator de qualidade dos resíduos do modelo RBD quando avaliado pelo Verify3D mostrou que 98,26% dos resíduos tiveram uma pontuação média $3D-1D \geq 0,2$, o que representa uma boa pontuação, sugerindo alta compatibilidade do modelo atômico 3D com sua sequência de aminoácidos. O gráfico de *Ramachandran* do ERRAT previu que o modelo final tinha 97,8% de resíduos em regiões favorecidas, 2,2% em regiões permitidas e 0,0% em regiões discrepantes (Figura 1C). Uma análise comparativa foi feita utilizando o algoritmo web ProSA II (Figura 1D), que previu que a estrutura final ganhou um Z-score de -5,91 e, portanto, também se enquadra na faixa de escores estabelecida em proteínas de tamanho semelhante, com qualidade de RMN.

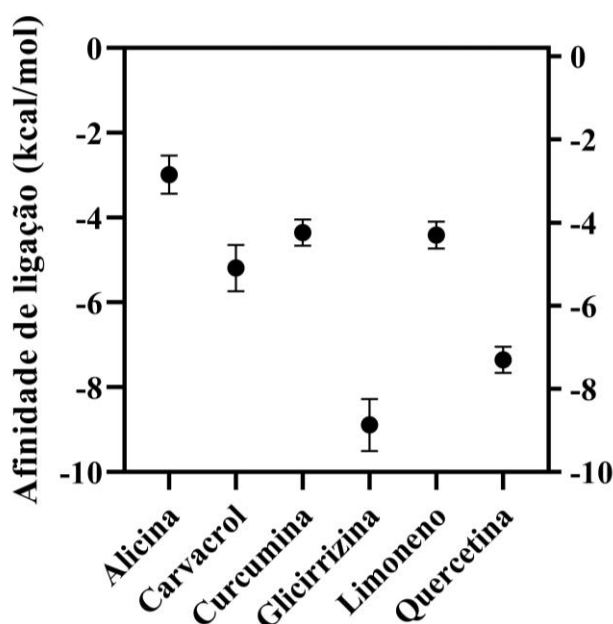
Figura 1: Homologia, análise de mutação e avaliação da estrutura de RBD modelada. (A) Sequenciamento e comparação de aminoácidos mutantes entre RBD sequenciada no Brasil com a estrutura da RBD original de Wuhan. (B) Sobreposição da estrutura de RBD modelada e estrutura RBD 6W41. (C) Gráfico *Ramachandran* da RBD modelada. (D) Gráfico de Z-Score da estrutura de RBD modelada.



Fonte: Autores.

A Figura 2 exibe o resultado da afinidade de ligação (kcal/mol) de todas as simulações de docking molecular. Os valores médios com desvio padrão simulações foram Alicina (-3.2 ± 0.81 kcal/mol), Carvacrol (-5.6 ± 0.95 kcal/mol), Curcumina (-4.9 ± 0.52 kcal/mol), Glicirrizina (-8.9 ± 1.22 kcal/mol), Limoneno (-4.5 ± 0.54 kcal/mol), Quercetina (-7.6 ± 0.47 kcal/mol). Observou-se que apenas duas simulações apresentaram dados de afinidade aceitáveis, abaixo de $-6,0$ kcal/mol, as estruturas de glicirrizina e quercetina. Em simulações computacionais de docking, moléculas que apresentam energia mais negativa são capazes de se ligar firmemente com macromoléculas-alvo (Pan et al., 2022).

Figura 2: Representação gráfica das energias de ligação (em kcal/mol) do docking molecular entre os ligantes Alicina, Carvacrol, Curcumina, glicirrizina, limoneno, quercetina e o alvo RBD.

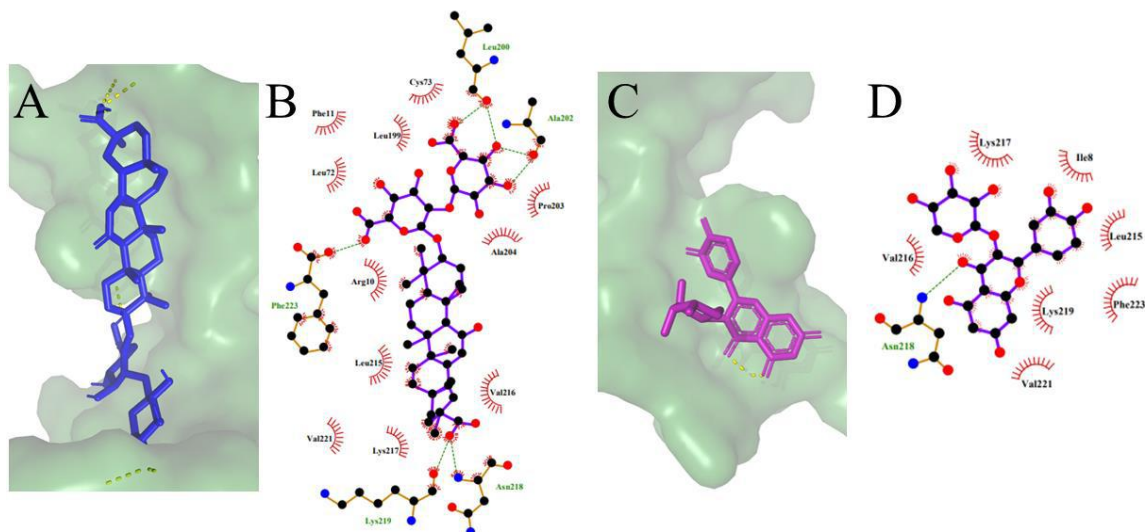


Fonte: Autores.

Deste modo, os complexos formados de RBD-quercetina e RBD-Glicirrizina seguiram para avaliação bidimensional de interações com resíduos e para análise de dinâmica molecular (RMSD e RMSF).

As interações entre as glicirrizina e quercetina e a estrutura-alvo RBD da proteína S em formato 3D são vistas respectivamente nas Figuras 3A e 3C. Nas imagens é visto que os dois ligantes se posicionaram na mesma cavidade da proteína, possivelmente o sítio ativo da estrutura de RBD. Na avaliação bidimensional é visto diversas ligações hidrofóbicas e de hidrogênio. Na figura 3B o complexo formado entre glicirrizina e a RBD mostrou 11 interações hidrofóbicas (ARG10, PHE11, LEU72, CYS73, LEU199, PRO203, ALA204, LEU215, VAL216, LYS217, VAL221) e 7 ligações de hidrogênio (LEU200, ALA202, LYS219, ASN218, PHE223). No complexo RBD-quercetina (Figura 3D) foi revelado 7 interações hidrofóbicas (ILE8, LEU215, VAL216, LYS217, LYS219, VAL221, PHE223), também foi visto uma ligação de hidrogênio formado pelo resíduo ASN218.

Figura 3: Representações 2D e 3D das interações entre átomos dos ligantes glicirrizina e quercetina e aminoácidos da região RBD. (A) interação 3D da glicirrizina na cavidade na RBD, (B) diagrama 2D da glicirrizina e aminoácidos da RBD. (C) Interação da quercetina na região da RBD. (D) diagrama 2D da quercetina e aminoácidos da RBD.



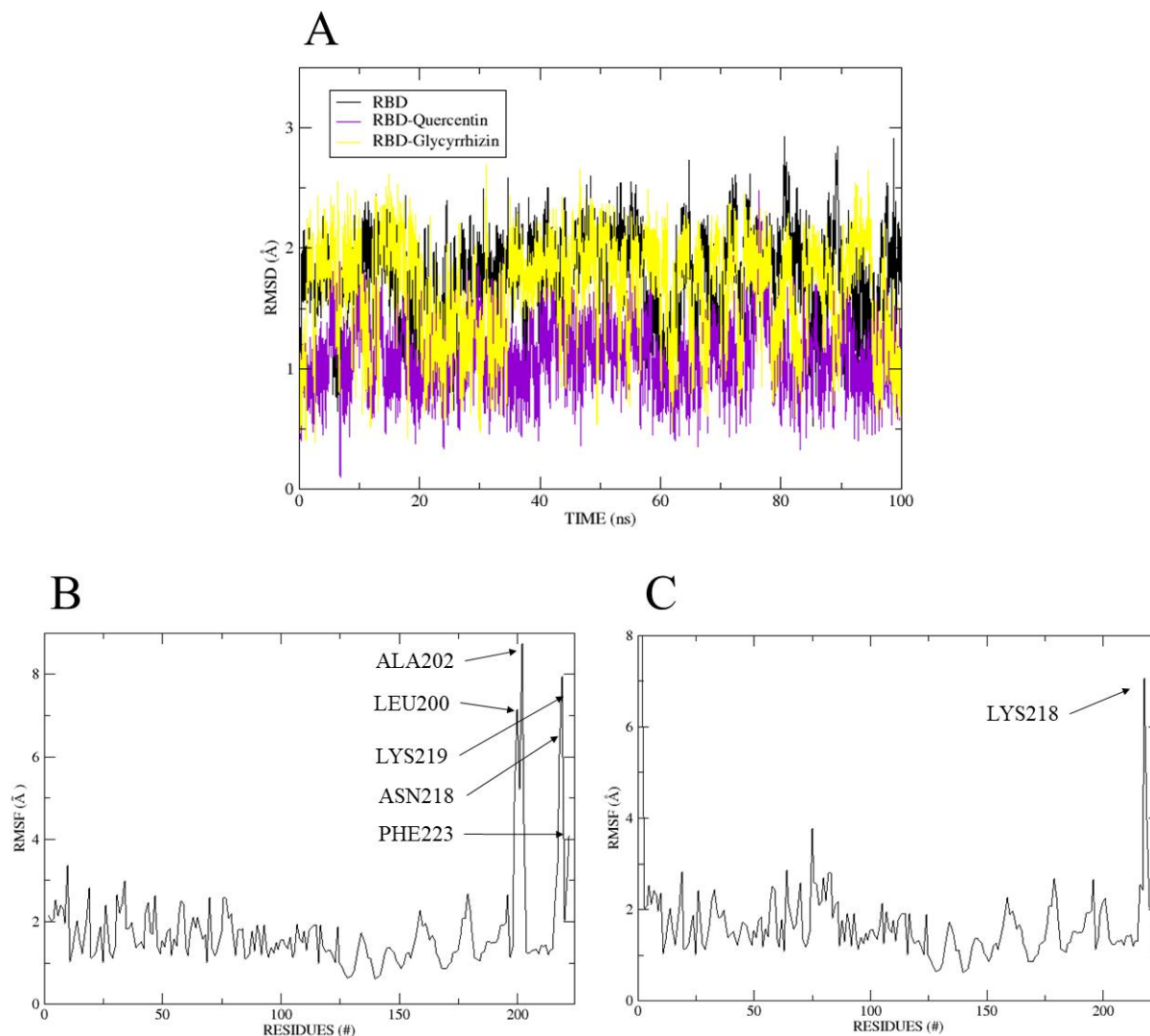
Fonte: Autores.

A avaliação de dinâmica molecular dos dois complexos foi avaliada pelas análises de *Root Mean Squared Deviation* (RMSD) e *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF).

O RMSD é uma medida do desvio na posição dos átomos Ca em relação ao quadro inicial, em função do tempo de simulação. Um valor RMSD de $\leq 2,00$ Å sugere que a estrutura da proteína permanece estável ao longo da simulação (AHMED, 2021). As parcelas de RMSD de RBD, Complexo RBD-glicirrizina e Complexo RBD-quercetina são mostradas na Figura 4A. Todas as simulações apresentaram estabilização com baixas variações (>1.05 Å) durante o tempo de 100 ns.

A análise RMSF examina flutuações residuais e flexibilidade durante a simulação. Quanto maiores as flutuações, menor será a estabilidade (Zarezade, 2021). Esse parâmetro é extremamente essencial para explorar o papel do aminoácido individual na estabilidade de qualquer complexo proteína-ligante (Shakya, 2020). O RMSF de cada aminoácido dos complexos de RBD-glicirrizina (Figura 4B) e RBD-quercetina (Figura 4C) flutuaram quase de maneira semelhante, com pequenas variações. Os resíduos LEU200, ALA202, LYS219, ASN218, PHE223 do complexo RBD-glicirrizina foi identificado no gráfico devido a sua flutuação de 7.13, 8.73, 7.93, 6.06, 6.37 Å, isso é possível devido à sua interação de hidrogênio visto na Figura 3C, assim confirmando os achados da análise de interações de resíduos. Enquanto na Figura 4C nota-se o maior pico de flutuação referente ao resíduo ASN218 com uma flutuação de 7.06 Å, assim também confirmando a ligação de hidrogênio vista no diagrama da Figura 3D.

Figura 4: Gráficos da análise de dinâmica molecular entre os ligantes glicirrizina e quercetina e a estrutura de RBD. (A) Gráfico RMSD das simulações dos complexos. (B) Gráfico RMSF do complexo RBD-glicirrizina. (C) Gráfico RMSF do complexo RBD-quercetina.



Fonte: Autores.

Desde o surto do novo coronavírus em dezembro de 2019, o vírus causou uma séria ameaça à saúde em todo o mundo em um ritmo acelerado. A morbidade e a mortalidade estão aumentando devido à falta de medicamentos específicos para SARS-CoV-2 e pela agressividade das variantes. Mutações relatadas do vírus SARS-CoV-2 também são o principal desafio que afeta a eficácia das vacinas. Sob esta circunstância, a descoberta de pequenas moléculas inibidoras de RBD pode ser outra abordagem crítica para proteger o público da infecção viral em vez de usar vacinas. A estruturas naturais utilizadas neste estudo apresentaram eficácia, e pode-se notar que compostos fitoquímicos têm menos efeitos colaterais no corpo humano, por isso são mais facilmente aceitos pelas pessoas, podendo ser considerados como uma perspectiva no combate ao COVID-19 (Zhang et al., 2021).

As plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas em todo o mundo, ganhando cada vez mais popularidade na sociedade moderna como alternativas naturais para medicamentos sintéticos e oferecendo grande potencial como novos antivirais, estudos que investigaram o perfil químico e a composição de plantas medicinais revelam a complexidade e variedade de compostos, contribuindo para os diversos usos das plantas no tratamento de inúmeras doenças, incluindo doenças

com risco de vida, como doenças virais e câncer (Mehrbood et al., 2020)

Entre vários produtos naturais polifenólicos, a quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) apresentou um ótimo resultado na simulação *in silico* do docking molecular, esta molécula é um flavonóide encontrado abundantemente em frutas e vegetais com diversas propriedades farmacológicas e terapêuticas, desempenhando um papel importante na proteção contra várias doenças, em virtude do seu potencial antioxidante (Batiha et al., 2020); anti-inflamatório, antiviral, antibacterianos e anticancerígeno (Gansukh et al., 2016; Mehrbood et al., 2020).

Os flavonoides demonstram ser potencialmente benéficos na terapia antiviral viral, podendo ser usados diretamente como medicamentos ou serem sintetizados para a produção de novos fármacos (Badshah et al., 2021).

Existe uma enorme quantidade de literatura que apoia as propriedades antiviral da quercetina. Em estudos *in vivo*, a quercetina demonstrou uma atividade antiviral dose-dependente contra os vírus herpes simplex, HSV-1 e HSV-2, em células culturas (Lyu et al., 2005; Lee et al., 2017). Vários estudos independentes *in vitro* demonstraram que ela é capaz de inibir a replicação de vários vírus respiratórios, como vírus influenza (Mehrbood et al., 2018), rinovírus (Dimova et al., 2003) e também o vírus da síndrome SARS (Di Pierro et al., 2021; Russo et al., 2020; Saakre et al., 2021).

Com a pandemia de COVID-19, flavonóides como a quercetina atraíram interesse dos cientistas sendo eles agentes promissores contra a infecção por SARS-CoV. Em um estudo de Glinksy e colaboradores (2020), sugere a eficácia da quercetina não apenas contra o SARS-CoV, mas também o SARS-CoV-2 possibilitando resultados que podem servir como base para o desenvolvimento de possíveis inibidores da infecção por SARS-CoV-2.

Nesse cenário, a quercetina e suas propriedades antivirais podem servir de contribuição para o tratamento da COVID-19, devido sua capacidade de inibir proteínas impedindo a infecção do vírus. Por outro lado, a glicirrizina também apresentou um ótimo resultado na estrutura RBD da proteína *spike* do SARS-CoV-2, variante ômicron. A glicirrizina já foi evidenciada devido a sua forte ação antiviral. É mencionado que ela pode estimular ação antiviral contra o vírus HIV-1 e o HSV1. Além de apresentar uma agradável interação com a mais importante protease viral Mpro do coronavírus, associado a uma menor energia de ligação, propiciando a comunicação entre o ligante e o receptor (Oliveira, 2020).

O efeito anti-SARS relacionado ao Coronavírus foi observado *in vitro*, nas fases preliminares do ciclo de replicação. O componente mais relevante que exerce influência sobre organismos vivos da *Glycyrrhiza*, a Glicirrizina, foi comprovado por relaciona-se diretamente com ECA2, indicando que a Glicirrizina tem potencial efeito terapêutico contra a COVID-19 (Silva, 2022). No entanto, ainda não foram visualizados estudos que mostrem a eficácia desta molécula natural na região RBD da proteína *spike* do vírus.

4. Considerações Finais

O presente estudo mostra que as moléculas naturais glicirrizina e quercetina podem atuar ligando-se à região RBD da proteína S — região de extrema importância para a entrada do vírus na célula. A estrutura de RBD foi modelada a partir do genoma da variante ômicron do SARS-CoV-2 encontrado no Brasil no ano de 2022, essa estrutura única e inexistente em banco de dados poderá ser útil para outras pesquisas.

Este trabalho pode colaborar com estudos futuros para avaliar o mecanismo de ação desses medicamentos contra o SARS-CoV-2, ressaltando a importância desses estudos no uso de moléculas naturais, uma vez que tais moléculas podem ser utilizadas como base para esses estudos e o conhecimento de possíveis mecanismos de ação em nível molecular é de extrema importância.

Além disso, aplicações de técnicas computacionais como triagem virtual, docking molecular e dinâmica molecular, demonstraram grande potencial de descobertas neste trabalho. Estas áreas podem contribuir na busca de fármacos de forma precisa, colaborando antes mesmo de realizar estudos *in vitro* e *in vivo*. O docking molecular possibilita a identificação de

substâncias que apresentam uma boa interação molecular ou não, com determinados alvos escolhidos, proporcionando uma redução no número de animais utilizados em pesquisas experimentais com substâncias ineficazes que não apresentam efeito biológico.

O estudo *in silico* é baseado em simulações computacionais, esses métodos como docking molecular e dinâmica, não substituem os testes experimentais, ficam limitados a triagem virtual de substâncias que podem ou não apresentar potencial terapêutico. Sendo importantes auxiliares e otimizadores no processo de desenvolvimento de novos fármacos. Assim, técnicas moleculares são necessárias para confirmar as atividades de interação vistas nestes estudos sendo perspectivas futuros desta pesquisa.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., & Lindahl E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1(2), 19–25.
- Adhikari, S. P., Meng, S., Wu, Y. J., Mao, Y. P., Ye, R. X., Wang, Q. Z., Sun, C., Sylvia, S., Rozelle, S., Raat, H., & Zhou, H. (2020). Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infectious diseases of poverty*, 9(1), 29.
- Ahmed, M. Z., Zia, Q., Haque, A., Alqahtani, A. S., Almarfadi, O. M., Banawas, S., Alqahtani, M. S., Ameta, K. L. & Haque, S. (2021). Aminoglycosides as potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: an in-silico drug repurposing study on FDA-approved antiviral and anti-infection agents. *J Infect Public Health*. 14(5): 611-9. doi: 10.1016/j.jiph.2021.01.016.
- Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 140, 111596.
- Barca, G., Bertoni, C., Carrington, L., Datta, D., De Silva, N., Deustua, J. E., Fedorov, D. G., Gour, J. R., Gunina, A. O., Guidez, E., Harville, T., Irle, S., Ivanic, J., Kowalski, K., Leang, S. S., Li, H., Li, W., Lutz, J. J., Magoulas, I., Mato, J., Gordon, M. S. (2020). Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. *The Journal of chemical physics*, 152(15), 154102.
- Batiha, E-S. G., Magdy Beshbishy, A., G Wasef, L., Elewa, Y., A Al-Sagan, A., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., M Abd-Elhakim, Y., & Prasad Devkota, H. (2020). Chemical Constituents and Pharmacological Activities of Garlic (*Allium sativum* L.): A Review. *Nutrients*, 12(3), 872.
- Benkert, P., Tosatto, S. C., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, 71(1), 261–277.
- Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. Z., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 42(W1), W252-W258.
- Boehm E., Kronig I., Neher R.A., Eckerle I., Vetter P., Kaiser L. (2021) Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic. *Clin. Microbiol. Infect.* 27:1109.
- Cabanillas, E. R. L., Risco, A. O. L., Risco, K. B. L., Hoyos, G. L. L., Zavaleta, R. M. L., Tirado, E. d. R. L., Saavedra, J. J. H. (2021). Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and in silico studies of potential pharmacological treatment. *Revista de la Facultad de Medicina Humana*, 21(2).
- Chen J. (2020). Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV-A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes and infection*, 22(2), 69–71.
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), 418–423.
- Christy, M. P., Uekusa, Y., Gerwick, L., & Gerwick, W. H. (2021). Natural Products with Potential to Treat RNA Virus Pathogens Including SARS-CoV-2. *Journal of natural products*, 84(1), 161–182.
- Darden T., York D., & Pedersen L. (1993). Particle mesh Ewald: An N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98(12), 10089–10092.
- Di Pierro, F., Derosa, G., Maffioli, P., Bertuccioli, A., Togni, S., Riva, A., Allegrini, P., Khan, A., Khan, S., Khan, B. A., Altaf, N., Zahid, M., Ujjan, I. D., Nigar, R., Khushk, M. I., Phulpoto, M., Lail, A., Devrajani, B. R., & Ahmed, S. (2021). Possible Therapeutic Effects of Adjuvant Quercetin Supplementation Against Early-Stage COVID-19 Infection: A Prospective, Randomized, Controlled, and Open-Label Study. *International journal of general medicine*, 14, 2359–2366.
- Dimova, S., Mugabowindekwe, R., Willems, T., Brewster, M. E., Noppe, M., Ludwig, A., Jorissen, M., & Augustijns, P. (2003). Safety-assessment of 3-methoxyquercetin as an antirhinoviral compound for nasal application: effect on ciliary beat frequency. *International journal of pharmaceutics*, 263(1-2), 95–103.

- Dodda, L. S., Cabeza de Vaca, I., Tirado-Rives, J., & Jorgensen, W. L. (2017). LigParGen web server: an automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands. *Nucleic acids research*, 45(W1), W331–W336.
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods in enzymology*, 277, 396–404.
- Elfiky A. A. (2020). Anti-HCV, nucleotide inhibitors, repurposing against COVID-19. *Life sciences*, 248, 117477.
- Elmezayen, A. D., Al-Obaidi, A., Şahin, A. T., & Yeleği, K. (2021). Drug repurposing for coronavirus (COVID-19): in silico screening of known drugs against coronavirus 3CL hydrolase and protease enzymes. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 39(8), 2980–2992.
- Favalli, E. G., Ingegnoli, F., De Lucia, O., Cincinelli, G., Cimaz, R., & Caporali, R. (2020). COVID-19 infection and rheumatoid arthritis: Faraway, so close!. *Autoimmunity reviews*, 19(5), 102523.
- Gansukh, E., Kazibwe, Z., Pandurangan, M., Judy, G., & Kim, D. H. (2016). Probing the impact of quercetin-7-O-glucoside on influenza virus replication influence. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 23(9), 958–967.
- Ghosh, R., Chakraborty, A., Biswas, A., & Chowdhuri, S. (2021). Evaluation of green tea polyphenols as novel corona virus (SARS CoV-2) main protease (Mpro) inhibitors - an in silico docking and molecular dynamics simulation study. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 39(12), 4362–4374.
- Glinsky G. V. (2020). Tripartite Combination of Candidate Pandemic Mitigation Agents: Vitamin D, Quercetin, and Estradiol Manifest Properties of Medicinal Agents for Targeted Mitigation of the COVID-19 Pandemic Defined by Genomics-Guided Tracing of SARS-CoV-2 Targets in Human Cells. *Biomedicines*, 8(5), 129.
- Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *The Journal of biological chemistry*, 295(37), 12910–12934.
- Hess B., Bekker H., Berendsen H. J. C., & Fraaije J. G. E. M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18(12), 1463–1472.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8.
- Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature*, 381(6580), 272.
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506.
- Hui, D. S., I Azhar, E., Madani, T. A., Ntoumi, F., Kock, R., Dar, O., Ippolito, G., Mchugh, T. D., Memish, Z. A., Drosten, C., Zumla, A., & Petersen, E. (2020). The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - The latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 91, 264–266.
- Iser, B. P. M., Sliva, I., Raymundo, V. T., Poletto, M. B., Schuelter-Trevisol, F., & Bobinski, F. (2020). Suspected COVID-19 case definition: a narrative review of the most frequent signs and symptoms among confirmed cases. In *SciELO Preprints*.
- Jaiswal, G., & Kumar, V. (2020). In-silico design of a potential inhibitor of SARS-CoV-2 S protein. *PloS one*, 15(10), e0240004.
- Kaminski G. A., Friesner R. A., Tirado-Rives J., & Jorgensen W. L. (2001). Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(28), 6474–6487.
- Khaerunnisa, S., Kurniawan, H., Awaluddin, R., Suhartati, S., & Soetjipto, S. (2020). Potential inhibitor of COVID-19 main protease (Mpro) from several medicinal plant compounds by molecular docking study. *Preprints 2020*, 2020030226.
- Khandia, R., Singhal, S., Alqahtani, T., Kamal, M. A., El-Shall, N. A., Nainu, F., Desingu, P. A., & Dhama, K. (2022). Emergence of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant, salient features, high global health concerns and strategies to counter it amid ongoing COVID-19 pandemic. *Environmental research*, 209, 112816.
- Kupferschmidt, K., & Vogel, G. (2021). How bad is Omicron? Some clues are emerging. *Science (New York, N.Y.)*, 374(6573), 1304–1305.
- Laskowski, R. A., Swindells, M. B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model*, 51(10): 2778-86.
- Lee, S., Lee, H. H., Shin, Y. S., Kang, H., & Cho, H. (2017). The anti-HSV-1 effect of quercetin is dependent on the suppression of TLR-3 in RAW 264.7 cells. *Arch Pharm Res*.
- Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., & Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of pharmaceutical analysis*, 10(2), 102–108.
- Lyu, S. Y., Rhim, J. Y., & Park, W. B. (2005). Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Arch Pharm Res*.
- Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., & Simmerling, C. (2015). ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*, 11(8), 3696–3713.
- Marinho, T. O., Lucena, H. L. de, Sousa, A. P. de, da Silva, F. A., Medeiros, T. K. F. de, Souza, O. F., Alves, M. de S., Medeiros, M. A. A., Brito Junior, L. de, & Oliveira Filho, A. A. (2022). Antiviral activity of 1,8-cineole monoterpene: in silico study. *Research, Society and Development*, 11(4), e31011427363.

- Mehrbod, P., Hudy, D., Shyntum, D., Markowski, J., Łos, M. J., & Ghavami, S. (2020). Quercetin as a Natural Therapeutic Candidate for the Treatment of Influenza Virus. *Biomolecules*, 11(1), 10.
- Miyamoto S., & Kollman P. A. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry*, 13(8), 952–962.
- OLIVEIRA, Rafael Willian. (2020). *Produtos Naturais no combate à Covid-19: uma revisão crítica de trabalhos publicados em 2020*. Trabalho de Conclusão de Curso em Química Licenciatura – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- Ospanov, M., León, F., Jenis, J., Khan, I. A., & Ibrahim, M. A. (2020). Challenges and future directions of potential natural products leads against 2019-nCoV outbreak. *Current plant biology*, 24, 100180.
- Pan, X., Wang, H., Zhang, Y., Wang, X., Li, C., Ji, C., & Zhang, J. Z. (2022). AA-Score: a New Scoring Function Based on Amino Acid-Specific Interaction for Molecular Docking. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Pence, H. E. & Williams, A. (2010). ChemSpider: an online chemical information resource. *J Chem Education*, 87(11), 1123-1124.
- Pontius, J., Richelle, J., & Wodak, S. J. (1996). Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *Journal of molecular biology*, 264(1), 121-136.
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Dhama, K., Yattoo, M. I., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Le infezioni in medicina*, 28(2), 174–184.
- Russo, M., Moccia, S., Spagnuolo, C., Tedesco, I., & Russo, G. L. (2020). Roles of flavonoids against coronavirus infection. *Chemico-biological interactions*, 328, 109211.
- Saakre, M., Mathew, D., & Ravisankar, V. (2021). Perspectivas sobre drogas à base de flavonoides vegetais para o novo SARS-CoV-2. *Revista da Universidade Beni-Suef de ciências básicas e aplicadas*, 10(1), 21.
- Schrödinger, L.L.C. *O Sistema gráfico Molecular PyMOL*, Versão 2.0 Schrödinger, LLC (2021).
- Shakya, A., Chikhale, R. V., Bhat, H. R., Alasmay, F. A., Almutairi, T. M., Ghosh, S. K., Alhajri, H. M., Alissa, S. A., Nagar, S., & Islam, M. A. (2022). Pharmacoinformatics-based identification of transmembrane protease serine-2 inhibitors from *Morus Alba* as SARS-CoV-2 cell entry inhibitors. *Molecular diversity*, 26(1), 265–278.
- Silva Neto, I. F., Ricardino, I. E. F., dos Santos, Í. T., de Lima, E. V. M., Souza, M. N. C., Marques, A. E. F., & Silva, M. R. (2020). Uma revisão da atividade antiviral do nim indiano e seu potencial frente ao novo coronavírus (SARS-CoV-2). *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, 17(1).
- SILVA, Débora Lays. (2022). *O uso de plantas medicinais em tempos de covid-19: uma revisão*. (Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia), Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – Paraíba – Brasil.
- Srinivasan, S., Cui, H., Gao, Z., Liu, M., Lu, S., Mkandawire, W., ... & Korkin, D. (2020). Structural genomics of SARS-CoV-2 indicates evolutionary conserved functional regions of viral proteins. *Viruses*, 12(4), 360.
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36(6), 1765-1771.
- Thakur, V., Bhole, S., Thakur, P., Patel, S., Kulshrestha, S., Ratho, R. K., & Kumar, P. (2022). SARS-CoV-2 waves and variants: understanding the causes and effect of the COVID-19 catastrophe. *Infection*, 50(2), 309-325.
- Tian, W., Chen, C., Lei, X., Zhao, J., & Liang, J. (2018). CASTp 3.0: atlas computado de topografia superficial de proteínas. *Pesquisa de ácidos nucleicos*, 46(W1), W363-W367.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving docking speed and accuracy with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W407–W410.
- World Health Organization (WHO) 2021. *Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern*. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern).
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell host & microbe*, 27(3), 325–328.
- Yang, J., Zheng, Y., Gou, X., Pu, K., Chen, Z., Guo, Q., Ji, R., Wang, H., Wang, Y., & Zhou, Y. (2020). Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis. *International journal of infectious diseases - IJID*, 94, 91–95.
- Zarezade, V., Rezaei, H., Shakerinezhad, G., Safavi, A., Nazeri, Z., Veisi, A., ... & Shajirat, Z. (2021). The identification of novel inhibitors of human angiotensin-converting enzyme 2 and main protease of Sars-Cov-2: A combination of in silico methods for treatment of COVID-19. *Journal of molecular structure*, 1237, 130409.
- Zhang, D., Hamdoun, S., Chen, R., Yang, L., Ip, C. K., Qu, Y., ... & Wong, V. K. W. (2021). Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with bio-layer interferometry. *Pharmacological Research*, 172, 105820.
- Zheng J. (2020). SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. *International journal of biological sciences*, 16(10), 1678–1685.
- Zhu, Z., Lian, X., Su, X., Wu, W., Marraro, G. A., & Zeng, Y. (2020). From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respiratory research*, 21(1), 1-14.