



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

PEDRO NONATO DA SILVA JÚNIOR

**ESTUDO *in silico* DAS INTERAÇÕES EM POTENCIAL ENTRE FLAVONOIDES E
ALVOS PROTEÍCOS NA INFECÇÃO DO SARS-COV-2**

FORTALEZA

2021

PEDRO NONATO DA SILVA JÚNIOR

ESTUDO *in silico* DAS INTERAÇÕES EM POTENCIAL ENTRE FLAVONOIDES E
ALVOS PROTEÍCOS NA INFECÇÃO DO SARS-COV-2

Monografia apresentada ao curso de Farmácia
da Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Coorientador: Farm. Emanuel Paula Magalhães

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- J1e Júnior, Pedro Nonato da Silva.
 Estudo in silico das interações em potencial entre flavonoides e alvos proteicos na infecção do SARS-COV-2 / Pedro Nonato da Silva Júnior. – 2021.
 76 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Enfermagem, Fortaleza, 2021.
 Orientação: Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio.
 Coorientação: Prof. Emanuel Paula Magalhães.
1. Flavonoides. 2. COVID-19. 3. Docking. I. Título.

CDD 610.73

PEDRO NONATO DA SILVA JÚNIOR

ESTUDO *in silico* DAS INTERAÇÕES EM POTENCIAL ENTRE FLAVONOIDES E
ALVOS PROTEÍCOS NA INFECÇÃO DO SARS-COV-2

Monografia apresentada ao curso de Farmácia
da Faculdade de Farmácia, Odontologia e
Enfermagem da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Nirla Rodrigues Romero
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Alice Maria Costa Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria das Dôres e Pedro Nonato, por serem meu alicerce e sempre tomarem minha educação como prioridade. Por renunciarem seus planos e sonhos em prol do meu futuro e bem estar e por me amarem acima de qualquer diferença que viemos a ter.

Ao meu orientador querido, Prof. Dr. Tiago Sampaio, por ter me acolhido e ter uma visão bastante otimista sobre esse projeto. Por ter acreditado no meu potencial e ter me encorajado a seguir persistindo quando eu não tinha mais forças pra isso e estava desacreditado com o mundo acadêmico. Agradeço a você professor, por me reconectar à minha vocação que sempre foi a paixão por lecionar e por ser uma inspiração!

Ao meu coorientador e amigo, Emanuel Magalhães, por toda paciência e ajuda durante esse processo. Você é muito querido e tenho muito orgulho de poder ter visto seu crescimento dentro dessa universidade e in(felizmente) você vai ter que me aguentar por algum tempo na pós-graduação.

À minha banca composta pela Prof^ª. Dra. Alice Martins e Prof^ª. Nirla Romero, por serem solícitas e abraçarem meu projeto com suas considerações enriquecedoras.

Ao Igor e Mac Dionys por ajudarem na construção desse trabalho, por toda paciência no ensinamento das metodologias.

Ao Laboratório de Carboidratos e Lectinas (Carbolec) e toda sua equipe, por ter me inserido na pesquisa e me proporcionado diversos ensinamentos.

Aos meus amigos queridos do grupo PAZ: Thiago, Ivna, Carina, Andréia, Amanda Diéssica, Emanuel, Brenna, Paloma, João, Vinícius e Beatriz por todas as experiências maravilhosas e perrengues que passamos no decorrer desses tempos de graduação.

À minha fada madrinha e amiga, Brenna Pinheiro, por ter sido a minha luz no momento de confusão. Graças a você pude entrar em contato com o professor Tiago e isso me abriu muitas portas. Obrigado por ser a definição de prestatividade me fazendo lembrar que amigos são de fato para todos os momentos.

Ao meu amigo Pedro Benício, pelas oportunidades e conselhos, pelos surtos e revoltas causados por Drag Race e por ter sido a minha voz da razão em momentos que me faltava clareza. Tenho certeza que essa amizade irá durar enquanto os 8 wins da Aja chegarem!

Às minhas amigas queridas Thaynara Carvalho e Carla Porto, as quais tive certa relutância de me aproximar a princípio e hoje não consigo me imaginar longe da alegria que é ter elas duas por perto. Vocês são o exemplo daquelas amizades improváveis, mas que agradeço todo dia pelo destino ter colocado vocês aqui comigo.

Ao meu amigo Lucas Mateus, por ter me acompanhado em várias disciplinas, estágios e aventuras no pokémon Go, além de ter surtado comigo nesse processo de último semestre com monografia e afins. Pelas risadas e raivas compartilhadas e por ter sido um irmão dentro desse curso.

A todos as meninas que me aproximei por conta do TCC e seleção do mestrado, Amanda Dias, Helaynne Nascimento, Lyanna Rodrigues e Brenna Pinheiro, pelo apoio mútuo e desespero compartilhado.

Aos meus bonitos, Daiana Alexandre, Brenda Vanine, Claudiane Carvalho e Nathannael Morais, por serem a definição de amizade, compartilhando comigo todos os momentos e conquistas e me fazendo lembrar que mesmo que o tempo passe e nossos caminhos tomem rumos diferentes, sempre estaremos aqui um pelos outros. O tempo é incapaz de nos mudar.

Aos meus irmãos mais velhos que a vida me presenteou, Felipe Paiva e Wendell Saraiva. Falar sobre vocês sempre me enche os olhos d'água por tudo que a gente já passou junto nesses anos de amizade. Eu vou ser eternamente grato por todos os conselhos, amparo emocional, todas as aventuras no pokémon Go. Eu vou ser eternamente grato por vocês chegarem e se fazerem família!

E por último e não menos importante, ao melhor amigo William Crisóstomo, por ter me acompanhado de perto nesse processo de escrita, ter tido paciência pra lidar comigo nos mais diversos estados de espírito, ter sido a palavra de incentivo e a minha sanidade. Por me fazer acreditar na felicidade e me lembrar que eu mereço isso, assim como todas as pessoas merecem ser amadas e bem-quistas. Por isso dedico essa vitória a nós dois e tenho certeza que essa é apenas a primeira de muitas!

Agradeço a todos vocês que acreditaram em mim e possibilitaram eu estar vivendo meus sonhos.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A pandemia de COVID – 19, que se originou na cidade chinesa de Wuhan na China, rapidamente se espalhou mundialmente tornando-se um problema de saúde pública sem precedentes. As consequências se refletem nos números de novos casos e óbitos que crescem diariamente, colocando em evidência a busca por abordagens terapêuticas para conter o avanço do vírus, como os produtos naturais. Nesse contexto, flavonoides são compostos polifenólicos provenientes do metabolismo secundários das plantas, que ganham destaque em um cenário atual onde a disponibilidade de alternativas antivirais é reduzida. Suas ações biológicas perante uma infinidade de doenças e microrganismos encontram-se bem descritas na literatura. Com base nesses achados, o trabalho avaliou, por meio de ensaios de *docking* molecular, as interações entre flavonoides e alvos enzimáticos e estruturais do SARS-COV-2, além da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) que possibilita a entrada vírus nas células do hospedeiro. Frente a proteinase principal (Mpro), a flavanona hesperedina foi o único composto a demonstrar o mesmo padrão de acoplamento que o inibidor natural N3, enquanto os demais compostos testados apresentaram ótimos escores de afinidade. Adicionalmente, os compostos naturais foram capazes de interagir com o complexo enzimático metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10 (Mt) na mesma região que o inibidor sinefungina. A interação com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), se deu no mesmo sítio que o inibidor lisinopril com afinidades variáveis. Esses dados sugerem que os flavonoides são capazes de interferir em processos de replicação e infecção do SARS-COV-2 através da inibição de modificações pós-traducionais das proteínas estruturais e da interação da partícula viral com a célula do hospedeiro, evidenciando o potencial farmacológico teórico e a viabilidade dessas moléculas para testes *in vitro*.

Palavras-chave: Flavonoides. COVID-19. *Docking*.

ABSTRACT

The COVID - 19 pandemic, which originated in the Chinese city of Wuhan in China, it has quickly spread worldwide and it has become an unprecedented public health problem. The consequences are reflected on the numbers of new cases and deaths that grows daily, highlighting the search for therapeutic approaches to curb the spread of the virus, such as natural products. In this context, flavonoids are polyphenolic compounds from the secondary metabolism of plants, which are highlighted in a current scenario where the availability of antiviral alternatives is reduced. Its biological actions in the face of a multitude of diseases and microorganisms are well described in the literature. Based on these findings, the work evaluated, through molecular docking assays, the interactions between flavonoids and structural and enzymatic targets of SARS-COV-2, in addition to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) that allows virus entry into cells host. In front of the main proteinase (Mpro), the flavanone hesperedin was the only compound to demonstrate the same coupling pattern as the natural inhibitor N3, while the other compounds tested showed excellent affinity scores. In addition, the natural compounds were able to interact with the NSP16-NSP10 heterodimer methyltransferase enzyme complex (Mt) in the same region as the inhibitor sinefungin. The interaction with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) occurred at the same site as the inhibitor lisinopril with variable affinities. These data suggest that flavonoids are capable of interfering in SARS-COV-2 replication and infection processes through the inhibition of post-translational modifications of structural proteins and the interaction of the viral particle with the host cell, evidencing the theoretical pharmacological potential and the viability of these molecules for in vitro tests.

Keywords: Flavonoids. COVID-10. Docking

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Componentes estruturais e genômicos do SARS-COV-2.....	17
Figura 2	– Principais alvos terapêuticos em potencial contra o SARS-COV-2.....	22
Figura 3	– Estrutura básica dos flavonoides e suas principais classes.....	25
Figura 4	– Interações teóricas entre o inibidor N3 e os flavonóides com a enzima Mpro.....	34
Figura 5	– Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e inibidor N3 com a enzima Mpro.....	35
Figura 6	– Interações teóricas entre o inibidor sinefungina e os flavonoides com a enzima metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10.....	37
Figura 7	– Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e sinefungina com a enzima metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10.....	39
Figura 8	– Interações teóricas entre os flavonoides e a proteína SPIKE.....	41
Figura 9	– Mapa bidimensional interações moleculares dos flavonoides e com a proteína SPIKE.....	43
Figura 10	– Interações teóricas entre o inibidor lisinopril e os flavonoides com a ACE2.....	45
Figura 11	– Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e lisinopril com a enzima ACE2.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Distribuição dos documentos analisados por programa de pós-graduação ...	20
Tabela 2	– Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da enzima Mpro.....	33
Tabela 3	– Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da enzima metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10.....	38
Tabela 4	– Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da proteína SPIKE.....	42
Tabela 5	– Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da enzima ACE2.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Alanina
CYS	Cisteína
ASP	Aspartato (Ácido aspartico)
GLU	Glutamato (Ácido glutâmico)
PHE	Fenilalanina
GLY	Glicina
HIS	Histidina
ILE	Isoleucina
LYS	Lisina
LEU	Leucina
MET	Metionina
ASN	Asparagina
PRO	Prolina
GLN	Glutamina
ARG	Arginina
SER	Serina
THR	Treonina
VAL	Valina
TRP	Triptofano
TYR	Tirosina
HSE	Histiina
Mpro	Proteinase principal do SARS-COV-2
Mt	Metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10 do SARS-COV-2
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2 humana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 A pandemia de COVID-19: precedentes e perspectivas	15
3.2 Características do SARS-COV-2	16
3.2.1 Genoma e estrutura	16
3.2.2 Aspectos clínicos e imunopatogênicos da infecção	18
3.2.3 Perspectivas de tratamento	21
3.3 Os flavonoides e suas aplicações biológicas	23
3.4 Docking molecular e sua relevância na investigação de novos fármacos	27
4 MATERIAS E MÉTODOS	29
4.1 Seleção dos alvos proteicos	29
4.2 Seleção dos ligantes	29
4.3 Predição da interação molecular	30
5 RESULTADOS	32
5.1 Interação entre as moléculas de flavonoides e a proteinase principal (Mpro)	33
5.2 Interação entre as moléculas de flavonoides e a metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10 (Mt)	36
5.3 Interação entre as moléculas de flavonoides e a proteína SPIKE	40
5.4 Interação entre as moléculas de flavonoides e a enzima conversora de angiotensina humana 2 (ACE2)	44
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

*“Nós temos muita coisa em comum, a mesma terra,
o mesmo ar, o mesmo céu. Talvez se olhássemos o
que temos em comum em vez de sempre procurar
o que temos de diferente... Bem, quem sabe?”*

(Meowth)

1 INTRODUÇÃO

O problema de saúde pública desencadeado pela pandemia da COVID-19 pode ser evidenciado pelo número de mortes e consequências socioeconômicas claramente observados em escala global. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, a doença já contabilizou mais de 119.000.000 de casos confirmados e mais de 2.600.000 mortes no início do mês de março de 2021 (WHO, 2021). No Brasil, de acordo com dados fornecidos pelo do Ministério da Saúde correspondentes a esse mesmo período, foram mais de 270.000 de mortes e um número superior a 11.000.000 de casos confirmados (CORONAVIRUS BRASIL, 2021).

A doença é causada pelo SARS-CoV-2, um vírus de RNA de cadeia simples positiva, não-segmentado e envelopado, capaz de levar a insuficiência pulmonar e infecção do trato respiratório fatal (ASTUTI, 2020). Este novo agente infeccioso, que foi responsável por causar sucessivos casos de pneumonia na província de Wuhan na China em dezembro de 2019, consiste em um betacoronavírus que está intimamente relacionado ao vírus SARS em termos genéticos (WU; MCGOOGAN, 2020).

O cenário emergencial instaurado pela pandemia alavancou a busca por novos medicamentos antivirais, a qual apresentou grandes progressos com a descoberta de compostos e alvos moleculares, bem como o aprimoramento da síntese orgânica. Apesar disso, o acervo de antivirais ainda é sucinto, o que incentiva o desenvolvimento de metodologias atualizadas que objetivem a investigação de novas moléculas com este potencial (JIANG; DU; SHI, 2020). Nesse contexto, a abordagem de modelos computacionais de ancoragem molecular ou *docking* molecular aplicados à busca de novos compostos ganha destaque, pois permite evidenciar o potencial de interação entre moléculas e alvos proteicos de interesse através de simulações computacionais rápidas e que exigem poucos recursos de seus usuários (ZAKI *et al.*, 2020).

Os flavonoides são produtos do metabolismo secundário de diversas plantas e são dotados de diversas propriedades biológicas de interesse, como ações benéficas sobre doenças neurodegenerativas, diabetes tipo 2, aterosclerose, doença cardiovascular e câncer. Destaca-se também sua atividade antiviral estabelecida para astrovírus, HIV, enterovírus, vírus sincial respiratório e vírus influenza tipo A (FRIEDMAN, 2007; PETERSON, 2021).

Com base nestes achados e diante da necessidade alarmante de novas abordagens terapêuticas para conter o avanço da pandemia, os flavonoides se configuram como excelentes candidatos na investigação de substâncias capazes de conter as manifestações da COVID-19. O *docking* molecular possibilita a caracterização do perfil de interação desses compostos

naturais com proteínas – chave no processo de infecção e replicação do SARS-COV-2, fornecendo dados referentes a natureza química das ligações e energia de afinidade apresentadas.

Portanto, o presente estudo se propõe a pesquisar as interações teóricas entre os flavonoides e alvos proteicos importantes na infecção por SARS-COV-2 através de ensaios *in silico*, além de prever o potencial antiviral desses compostos naturais através de comparações com inibidores conhecidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as interações em potencial entre flavonoides e alvos proteicos na infecção por SARS-COV-2

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar as distâncias, energias livre de ligação e potencial ocorrência das interações moleculares em cada acoplamento através da determinação da energia de afinidade dos flavonoides pelos alvos proteicos;
- Correlacionar possíveis semelhanças estruturais presentes nos flavonoides com o padrão de interação nos resíduos de aminoácidos nos alvos proteicos;
- Utilizar os dados das simulações *in silico* para prever a ação antiviral dos flavonoides a partir de comparações feitas com inibidores conhecidos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A pandemia de COVID-19: precedentes e perspectivas.

Os coronavírus formam um grupo diversificado de espécies virais capazes de infectar uma gama de animais distintos, incluindo humanos. O SARS-COV e MERS-COV são vírus de origem zoonótica e dotados de alta patogenicidade que surgiram nos anos de 2002 e 2012, respectivamente, com a capacidade de causar doenças respiratórias letais, definindo esses agentes etiológicos emergentes como um novo e alarmante problema de saúde pública do século XXI (CUI; LI; SHI, 2019).

Em meados de dezembro de 2019, vários hospitais de Wuhan, região localizada na província de Hubei (China), reportaram a existência de grupos de pacientes com pneumonia de causa desconhecida. Similarmente ao observado em indivíduos com SARS ou MERS, esses enfermos apresentaram sintomas de pneumonia viral, incluindo febre, tosse e desconforto no peito e, em casos graves, dispneia e infiltração pulmonar bilateral (GRALINSKI; MENACHERY 2020).

Deng e Peng (2020) destacou que a maioria dos casos reportados estava epidemiologicamente ligada ao Mercado de Frutos do Mar de Huanan, local de venda de animais vivos incluindo aves e animais silvestres, e complementarmente, estudos retrospectivos comprovam que o primeiro caso ocorreu por volta de 8 de dezembro de 2019. No fim desse mesmo mês, a Comissão de Saúde Municipal de Wuhan notificou a existência de um surto de pneumonia à Organização Mundial de Saúde (HUI *et al.*, 2020).

A determinação do agente etiológico foi possível através do sequenciamento de RNA metagenômico do vírus, obtido de amostras de lavado broncoalveolar de pacientes com quadro de pneumonia grave (ZHU *et al.*, 2020). Simultaneamente, novos casos de infecção em indivíduos sem contato com o Mercado Atacadista de Huanan e no ambiente hospitalar indicavam a transmissão comunitária desse betacoronavírus, que dentro de um mês, foi capaz de se alastrar massivamente por todas 34 províncias chinesas (WANG *et al.*, 2020).

Em meados de fevereiro o novo coronavírus foi denominado de “SARS-COV-2” e a doença de “COVID-19” pelo Comitê de Taxonomia Viral e a OMS, respectivamente (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). Esse mês foi marcado pela disseminação acelerada do vírus em escala global, com relatos diários de grupos crescentes de infectados em diferentes países (QIU *et al.*, 2020). Os mecanismos eficientes de transmissão do SARS-COV-2 e o número de viagens internacionais colaboraram para essa situação, o que levou a OMS definir o surto global de COVID-19 como

uma pandemia, no dia 11 de março de 2020 (WHO, 2020).

Desde então, enquanto na China a COVID-19 gradativamente tornou-se controlado, em regiões como as Américas e Europa observou-se um grande salto no número de casos confirmados e óbitos (FISHER; HEYMANN, 2020). Segundo dados referentes a primeira quinzena do mês de março de 2021, obtidos do Painel do Coronavírus da OMS (<https://covid19.who.int>), são registrados mais de 119.900.000 de casos confirmados da doença e número de mortes acima de 2.650.000. Atualmente, o Brasil se configura como o segundo país com o maior número de casos confirmados e mortes, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (WHO, 2020).

3.2 Características do SARS-COV-2

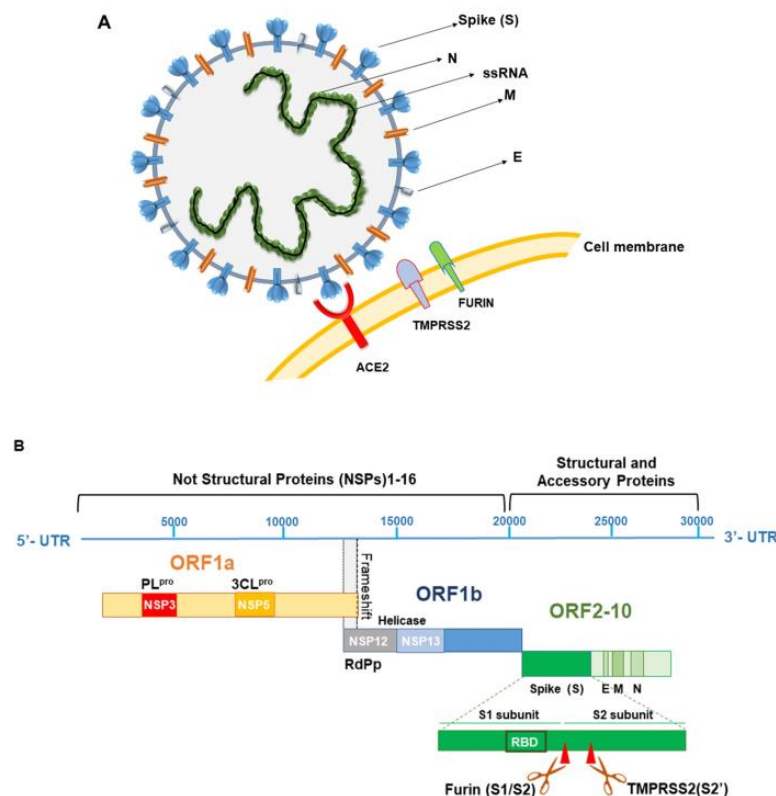
3.2.1 Genoma e estrutura

Os coronavírus são vírus de RNA de fita simples, sentido positivo e envelopados. O SARS-COV-2 pertence à família Coronaviridae e ao gênero Betacoronavirus grupo 2, sendo altamente patogênico assim como outros pertencentes ao mesmo gênero (RUSSO *et al.*, 2020).

Em termos de semelhanças na sequência genômica, o SARS-COV-2 é 80% idêntico ao SARS-COV e 50% ao MERS-COV (ZHOU *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020). O genoma deste patógeno compreende 14 fases de leitura aberta (ORFs), dos quais dois terços codificam 16 proteínas não-estruturais (NSPs 1 – 16) que compõem o complexo replicase e um terço codifica 9 proteínas acessórias e 4 proteínas estruturais: spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), sendo a Spike a mediadora da entrada do vírus nas células do hospedeiro (LU, 2020). As proteínas M e E estão relacionadas na montagem e liberação dos vírions enquanto a proteína N se liga ao RNA genômico (gRNA), gerando a simetria helicoidal dessa estrutura (ZHANG; HOLMES, 2020). Os aspectos estruturais e genômicos do coronavírus encontram-se ilustrados na figura 1.

A proteína S possui um domínio receptor-obrigatório (RBD) que intercede o contato direto com seu receptor celular, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e um sítio de clivagem polibásico S1/S2, o qual sofre a ação proteolítica das enzimas celulares furina e serinoprotease transmembrana 2 (TMPRSS2) (HOFFMANN *et al.*, 2020). Ambas auxiliam na fusão do vírus com a superfície da membrana plasmática, facilitando o processo de endocitose. Após a entrada, o gRNA liberado no citosol, de forma que as porções ORF1a e ORF1b são traduzidas pelos ribossomos da célula hospedeira nas poliproteínas pp1a e pp1b (V'KOVSKI *et al.*, 2020).

Figura 1 – Componentes estruturais e genômicos do SARS-COV-2



Fonte: Adaptado de Russo *et al.* (2020). A. Estrutura envelopada do SARS-COV-2 prestes a infectar uma célula. B. Genoma, genes e proteínas do SARS-COV-2.

Essas poliproteínas são clivadas pela ação da proteinase principal (Mpro) do SARS-COV-2 gerando as NSPs que formam diversos complexos enzimáticos importantes para a replicação viral, como por exemplo RNA polimerase RNA-dependente (RdRp), composta pela porção catalítica formada pela NSP12 e seus dois cofatores NSP7 e NSP8) e a metiltransferase gerada a partir da dimerização entre NSP16 e NSP10 (V'KOVSKI *et al.*, 2020; MENACHERY; DEBBINK; BARIC, 2014).

A proteinase principal do SARS-COV-2, também conhecida como protease tipo 3C, responsável pela produção de diversas poliproteínas essenciais para o ciclo de vida viral através de reações de clivagem necessárias para manutenção da replicação e transcrição deste patógeno (DAI *et al.*, 2020). O grande interesse no estudo dessa enzima como alvo antiviral se destaca devido a mesma não apresentar homólogos em humanos (YANG *et al.*, 2005).

NSP16 é essencial para o ciclo de replicação viral, já que propicia a evasão do coronavírus do sistema imune do hospedeiro (MORALES *et al.*, 2020). Ela compõe o complexo de replicação – transcrição do vírus, facilitando a transferência de um grupo metil do seu cofator S-adenosil-metionina (SAM) para a 2'-hidroxila da ribose pertencente ao RNA mensageiro

viral (CHEN *et al.*, 2011). Essa metilação camufla o mRNA para que não seja reconhecido por receptores de reconhecimento de patógenos intracelulares, como o RIG-1 e IFIT (DAFFIS *et al.*, 2010). A interação da NSP16 com seus ligantes só é possível na presença de outra proteína não estrutural, a NSP10, a qual ativa o complexo enzimático por provocar mudanças conformacionais na NSP16, permitindo que ela libere as regiões de ligação do SAM e RNA e que estes estabeleçam a conexão (VITHANI *et al.*, 2020).

As proteínas não-estruturais induzem o rearranjo do retículo endoplasmático (RE) em vesículas de membrana dupla, onde os complexos de replicação são ancorados. A partir disso, a RdRp utiliza o gRNA como molde para sintetizar uma fita completa de RNA negativo, que por sua vez serve de modelo para a produção de um novo RNA genômico positivo e um conjunto de RNAs subgenômicos (sgRNA), gerados num processo de transcrição descontínua. A tradução desses sgRNA resultam nas proteínas estruturais e acessórias já mencionadas. (ZHANG; HOLMES, 2020).

A construção das partículas virais ocorre no complexo intermediário RE-Golgi sob o controle da proteína M que atua como um arcabouço para o processo, pois as interações homotípicas que estabelece entre as proteínas S e N permitem o recrutamento de outros polipeptídios estruturais para o local de montagem. Os gRNA positivos são incorporados aos vírions recém-sintetizados, que são secretados da membrana plasmática por exocitose. (ZHANG; HOLMES, 2020).

3.2.2 Aspectos clínicos e imunopatogênicos da infecção

O tempo de incubação da COVID-19 varia de dois a catorze dias. Jiang *et al.* (2020) destacam que os primeiros sintomas surgem no quarto a sétimo dia de infecção e ressalta que a frequência dos casos assintomáticos é incerta. Nos casos leves, o tempo de recuperação observado é de duas a três semanas, enquanto o período correspondente para casos graves é de até seis semanas. A transmissão viral atinge seu pico até 48h após o surgimento dos sintomas, podendo se estender até doze dias nos casos leves a moderados e duas semanas nos casos graves (HASSAN *et al.*, 2020).

Para Wang *et al.* (2020) a doença pode se apresentar clinicamente de quatro formas. Nos casos leves, os sintomas são brandos assim como os indícios de pneumonia por exame de imagem. Os pacientes com quadro moderado apresentam febre e sintomas respiratórios com achados radiológicos de pneumonia, enquanto os pacientes severos podem apresentar falta de ar ($FR \geq 30$ respirações/min), saturação de oxigênio $\leq 93\%$ em repouso e lesão progressiva do

pulmão superior a 50% num intervalo de até 48h. O caso evolui a crítico quando o paciente adquire insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica, choque séptico ou falência múltipla dos órgãos.

A patogênese associada a infecção por SARS-COV-2 se inicia com a invasão do vírus nas células humanas que expressam a ACE2, que atua como receptor desse patógeno (XU *et al.*, 2020). Quando internalizados os componentes virais podem ser reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), levando a uma cascata de sinalização celular que culmina na produção de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF, IFN- γ) e antivirais (interferons do tipo I e III). Esses mediadores são os responsáveis por conduzir a resposta inata e adaptativa contra o vírus (ZHONG *et al.*, 2020).

As citocinas são mediadores essenciais do sistema imunológico com um amplo conjunto de funções, que vão desde a regulação da inflamação para a ativação das células, a proliferação ou a diferenciação (SALIN; XAVIER, 2014). No contexto da imunopatogenia da COVID-19, a grande produção de citocinas, tais como, interferons, interleucinas, quimiocinas), ocorre inicialmente pelas células apresentadoras de antígeno. A célula dendrítica produz IL-12, que por sua vez estimula a produção e liberação de TNF e IFN- γ por outras células da imunidade inata e adaptativa (TOOR *et al.*, 2020). IL-12 e IFN- γ são os mediadores responsáveis pela polarização da resposta de células T *helper* para o perfil Th1 nesse contexto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O TNF é um membro típico da família das citocinas, que promove inflamação, diferenciação e apoptose de células endoteliais (GUO *et al.*, 2019). Del Valle *et al* (2020) reforçam que, no âmbito da infecção por SARS-Cov-2, níveis circulantes elevados desse mediador contribuem para danos a órgãos, sendo um forte preditor de mal prognóstico, mesmo na ausência de outros fatores de risco, como idade, sexo, hipóxia, complicações de doença de base e altos níveis séricos de IL-6.

É relatado que pacientes com mau prognóstico apresentam uma diminuição progressiva da produção de IFN-I, promovendo uma hiperativação com consequente exaustão da resposta mediada por linfócitos T (HADJADJ *et al.*, 2020). Por sua vez, os componentes da imunidade adquirida possuem uma participação essencial na resolução do quadro infeccioso, atribuído a atividade citotóxica das células T CD8⁺ ativadas, assim como a ação das células T *helper* que induz a produção de anticorpos mais eficazes pela célula B. Contudo, é possível observar linfopenia associada a COVID-19 atribuída ao acúmulo dessa população de células

nos tecidos acometidos pelo vírus, como também à indução de morte nos linfócitos T (CHEN *et al.*, 2020).

Indivíduos acometidos pela infecção por SARS-COV-2 demonstram níveis séricos aumentados de citocinas características de respostas linfocitárias Th1 (IL-12 e $\text{INF-}\gamma$) e Th2 (IL-10) (WAN *et al.*, 2020). A interleucina 10 é uma citocina anti-inflamatória potente, que desempenha um papel crucial, muitas vezes essencial, na prevenção de doenças inflamatórias e autoimunes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Salim *et al.* (2014) destacam que a deficiência ou expressão anormal de IL-10 pode aumentar a resposta inflamatória ao desafio microbiano. Em adição, McKinstry *et al.* (2009) afirmaram que a expressão de IL-10 pode ter efeito concomitante de atenuar a inflamação e inibir a efetividade acentuada de uma resposta imune polarizada pelo perfil Th1. Corroborando com esses achados, Zhou *et al.* (2020) relatam que altos níveis de IL-10 foram notados em pacientes severos e que isso pode estar associado a uma síndrome da resposta antiinflamatória compensatória, a qual pode ser o motivo de quadros de infecções secundárias e sepse em sobreviventes.

A ampla liberação dos mediadores oriundos do processo inflamatório intenso desencadeado pela infecção viral, pode conferir ao paciente a denominada “tempestade de citocinas”, termo descritivo para abranger uma gama de observações que estão ligadas à hiperativação descontrolada do sistema imunológico e excessiva liberação de citocinas que podem resultar em falência multissistêmica de órgãos e morte (SOY *et al.*, 2020). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares empregados por essas citocinas na indução desse fenômeno não foram bem descritos (KARKI *et al.*, 2021).

A resposta mediada por anticorpos no contexto da COVID-19 não se correlaciona a fatores como idade, sexo ou comorbidades, de forma que a produção dessas moléculas já pode ser detectada a partir do quinto dia do início dos sintomas (CERVIA *et al.*, 2020). Estudos recentes relatam que os títulos de IgA e IgG apresentados pelos pacientes estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de casos mais graves da doença, de forma que pacientes assintomáticos demonstram uma resposta humoral mais branda sem muita distinção em termos de carga viral apresentada quando comparados a pessoas sintomáticas (NI *et al.*, 2020).

Alguns pontos relacionados a imunidade humoral frente ao SARS-COV-2 necessitam de uma investigação mais aprofundada, como a influência dos anticorpos para o estabelecimento do quadro inflamatório, bem como a participação dos anticorpos neutralizantes perante a replicação viral e a manutenção de sua resposta protetora, já que pacientes

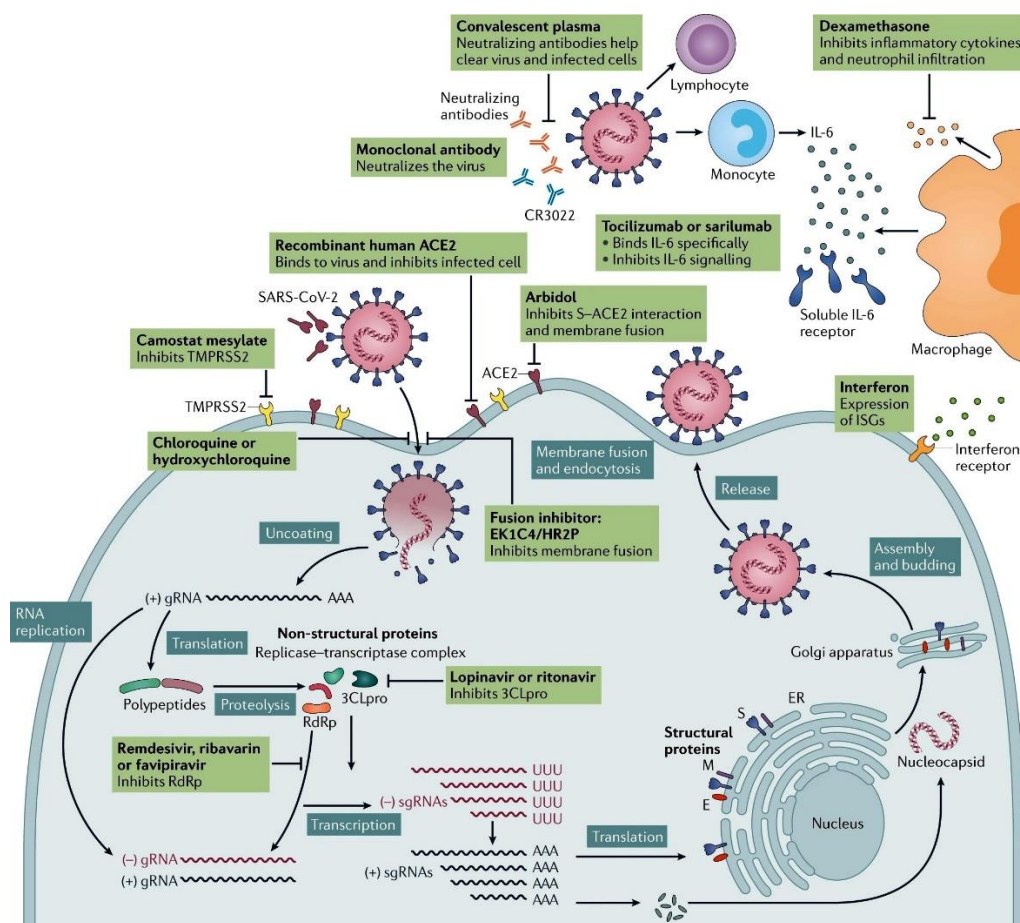
recuperados costumam apresentar baixas concentrações séricas de imunoglobulinas após a infecção (TO *et al.*, 2020).

No âmbito dos anticorpos neutralizantes, destaca-se a importância da proteína N para o desenvolvimento dessas moléculas. Gao *et al.* (2020) relata que as proteínas do nucleocapsídeo são capazes de ativar a via das lectinas do sistema complemento, a qual é responsável por promover a piora do prognóstico do paciente através da intensa inflamação e lesão pulmonar.

3.2.3 Perspectivas de tratamento

Até o presente momento, não existem terapias comprovadamente eficazes para COVID-19 ou antivirais específicos contra o SARS-COV-2, apesar de que alguns tratamentos tenham demonstrado resultados promissores em certos subgrupos de pacientes. Pesquisadores e fabricantes têm realizados ensaios clínicos em larga escala com o intuito de descobrir novos agentes terapêuticos (HU *et al.*, 2021). As terapias mais favoráveis no combate ao COVID-19 encontram-se ilustradas na figura 2

Figura 2 – Principais alvos terapêuticos em potencial contra o SARS-COV-2.



Fonte: Hu *et al.* (2021).

Dentre os fármacos que atuam na inibição da entrada do vírus na célula destacam-se o umifenovir e o mesilato de nafamostatato. O primeiro é um medicamento utilizado para o tratamento de gripe e infecções do trato superior aprovado na Rússia e China. Além de demonstrar inibição do SARS-CoV-2 em teste *in vitro*, dados clínicos revelam que esse composto é mais eficaz no tratamento da doença que lopinavir e ritonavir, porém estudos evidenciam que ele pode não influir na melhora e depuração do vírus em pacientes com sintomas leves e moderados (ZHU *et al.*, 2020). O nafamostatato é utilizado no tratamento de pancreatite e esofagite de refluxo pós-operatória no Japão. Sua ação vem da capacidade de inativar a TMPRSS2, demonstrando assim seu potencial antiviral contra a infecção por SARS-CoV-2, embora ainda não existam dados clínicos que comprovem sua eficácia (KAWASE *et al.*, 2020).

Outros fármacos com potencial de interferir na entrada do SARS-CoV-2 são a cloroquina e a hidroxicloroquina, porém seu uso é bastante controverso. Tais medicamentos têm sido utilizados na prevenção e tratamento da malária e doenças autoimunes, sendo capazes

de promover a glicosilação dos receptores celulares e interferir na ligação vírus – hospedeiro. Atualmente, não existe consenso científico quanto à eficácia desse fármacos no tratamento da COVID-19, pois mesmo que alguns estudos demonstrem que essas substâncias foram capazes de impedir a infecção *in vitro*, os dados clínicos apresentados são insuficientes (WANG *et al.*, 2020; YAO *et al.*, 2020). Complementarmente, estudos clínicos realizados por Rosemberg *et al.* (2020) e Geleris *et al.* (2020) evidenciaram que o uso de cloroquina e hidroxicloroquina poderia aumentar o risco de morte por parada cardíaca em pacientes quando comparados aos tratados com placebo.

Os inibidores da replicação viral incluem os fármacos que atuam sobre a proteinase principal: lopinavir e ritonavir e aquelas que atuam sobre a RNA polimerase RNA-dependente: remdesivir, favilavir e ribavarina (LI *et al.*, 2020; TAHIR UL QAMAR *et al.*, 2020). Outra abordagem terapêutica possível envolve o uso de agentes imunomodulatórios como tocilizumabe e sarilumabe. Esses compostos são dois anticorpos específicos ao receptor de IL-6 usados anteriormente no tratamento de artrite reumatóide, que demonstraram eficácia no tratamento de COVID-19 grave ao atenuar os efeitos da tempestade de citocinas (XU *et al.*, 2020; DIURNO *et al.*, 2020).

O tratamento com plasma convalescente é outra terapia adjuvante promissora para COVID-19 uma vez que achados preliminares sugeriram melhora do estado clínico após a sua administração. No entanto, este tratamento pode ter efeitos adversos, causando o agravamento da infecção através da ação dos anticorpos, lesões agudas no pulmão e reações alérgicas associadas à transfusão (DUAN *et al.*, 2020; SHEN *et al.*, 2020).

3.3 Os flavonoides e suas aplicações biológicas

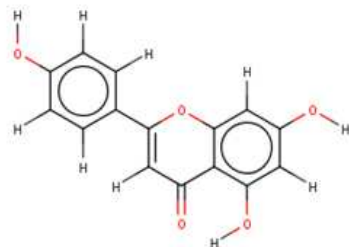
Os flavonoides compõem um grande grupo de substâncias polifenólicas dotadas de uma estrutura benzo- γ -pirona, que estão presentes nas plantas como metabólitos secundários. São sintetizados pela via dos fenilpropanóides em resposta a um agente infeccioso, como também agem como um sistema antioxidante em tecidos vegetais expostos a estresses bióticos e abióticos. Suas atividades dependem da estrutura química apresentada, que podem variar de acordo com o grau de hidroxilação, substituições, conjugações e grau de polimerização (KUMAR; PANDEY, 2013).

Do ponto de vista químico, os flavonoides são estruturas baseadas num esqueleto de 15 carbonos, composto por dois anéis benzênicos (A e B, conforme ilustrado na figura 3) unidos através de um anel pirano (C). A partir dos diferentes níveis de oxidação e padrões de substituições apresentados no anel C nas classes flavonas, flavonóis, flavanonas, flavananóis e

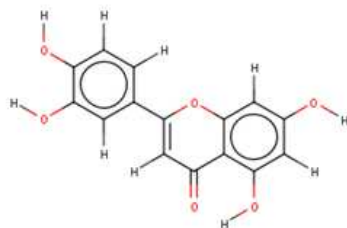
isoflavonas. Enquanto isso, é possível distinguir os compostos pertencentes a um mesmo grupo a partir dos padrões de substituição demonstrados nos anéis A e B. De uma forma geral, os flavonoides são frequentemente hidroxilados nas posições 2, 3, 5, 7, 3', 4' e 5' (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Figura 3 – Estrutura básica dos flavonoides e suas principais classes

FLAVONAS

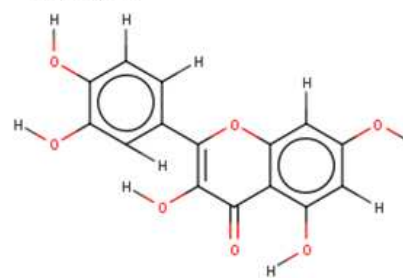


Apigenina

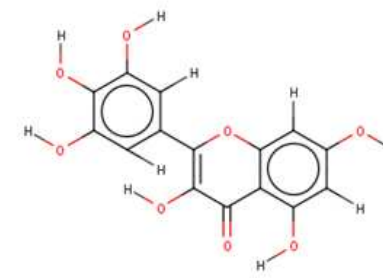


Luteolina

FLAVONÓIS



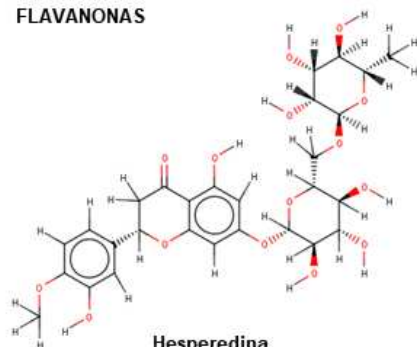
Quercetina



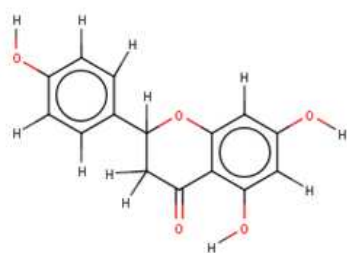
Miricetina



FLAVANONAS

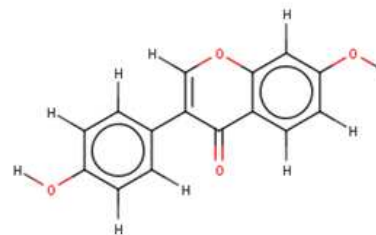


Hesperedina

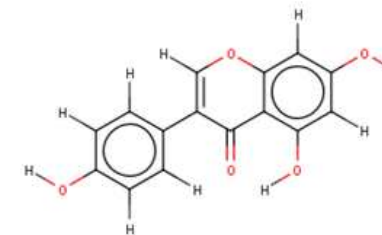


Naringenina

ISOFLAVONAS



Daidzeína



Genisteína

Fonte: Adaptado de Kumar e Pandey (2013).

As flavonas compõem um dos subgrupos mais relevantes entre os flavonoides, sendo amplamente encontradas na sua forma glicosídica no aipo, salsa, pimentão vermelho, camomila e ginkgo biloba. Esses compostos apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e uma cetona na posição 4 do anel C, de forma que é possível notar a presença de hidroxila na posição 5 do anel A em alguns vegetais. A hidroxilação em outras regiões, como por exemplo na posição 7 do anel A e nas posições 3' e 4' do anel B, varia de acordo com a classificação taxonômica da fruta ou hortaliça em questão. Como principais exemplos dessa classe, temos a apigenina, a luteolina e a tangeritina (MANACH *et al.*, 2016).

As principais fontes de flavonóis conhecidas são cebola, couve, alface, tomate, maçã, uva e frutas vermelhas. Essas substâncias, que também podem ser encontradas no vinho, são percussores das proantocianinas e tem seu consumo associado a efeitos antioxidantes de vasoprotetores. Seus principais representantes são a quercetina, a miricetina e o kaempferol. Quando comparados às flavonas, essa classe apresenta um grupo hidroxila na posição 3 que é passível de glicosilação. Ademais, os padrões de metilação, hidroxilação e glicosilação são diversos, o que caracteriza esse subgrupo como um dos mais recorrentes entre frutas e vegetais (IWASHINA, 2015).

Flavanonas ou dihidroflavonas configuram uma importante classe de flavonoides associada a diversos benefícios à saúde, como por exemplo, efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e hipocolesterolemiantes (MAHMOUD *et al.*, 2019). Estruturalmente, apenas se diferenciam das flavonas por apresentarem o anel C saturado, isto é, tais compostos não apresentam ligação dupla entre os carbonos 2 e 3. Esses compostos são principalmente encontrados em frutas cítricas, sendo responsáveis por conferir o sabor amargo a esses alimentos. Os principais representantes da classe são a naringenina, a hesperetina e sua forma glicosídica, hesperidina (IWASHINA, 2015).

Já os isoflavonoides apresentam distribuição limitada nos vegetais, sendo encontrados predominantemente na soja e outras leguminosas. Seus principais integrantes são as isoflavonas genisteína e daidzeína, consideradas fitoestrógenos devido sua atividade estrogênica em certos modelos animais. A genisteína é capaz de induzir alterações hormonais e metabólicas e dessa forma atuar sobre diferentes vias patológicas (MATTHIES *et al.*, 2008).

Os flavonoides são moléculas sabidamente antioxidantes e isto depende do arranjo dos grupos funcionais sobre a estrutura nuclear. A configuração, substituição e o número total de hidroxilas influenciam substancialmente nos mecanismos dessa atividade biológica, que compreendem a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) ou a

supressão desses componentes pela inativação de enzimas e quelação de oligoelementos, assim como a regulação positiva e proteção das reservas antioxidantes do organismo (MISHRA; KUMAR; PANDEY, 2013).

A configuração das hidroxilas no anel B constitui o elemento mais importante para a eliminação de radicais livres, pois esse grupamento é capaz de doar hidrogênio e um elétron para os radicais hidroxil, peroxil e peroxinitrito, os estabilizando e produzindo um radical flavonóide relativamente estável. Os íons metálicos livres incentivam a produção de radicais pela redução do peróxido de hidrogênio, gerando o radical hidroxila altamente reativo. Por apresentarem potenciais redox baixos, os flavonoides são termodinamicamente capazes de conter a ação oxidantes desses elementos (KUMAR; PANDEY, 2013). Além disso, essas moléculas naturais são capazes de quelar íons metálicos, impossibilitando a produção de espécies reativas por esta via (SADOWSKA-BARTOSZ; ADAMCZYK; BARTOSZ, 2014).

Vários flavonoides incluindo glicosídeos de apigenina, galangina, flavona, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e chalconas demonstram potente atividade antibacteriana. Eles demonstraram ser capazes de formar complexos com proteínas através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, e desta forma, inativar adesinas, enzimas e proteínas de transporte do envelope microbiano. Ademais, flavonoides lipofílicos podem romper as membranas desses microrganismos (MISHRA; KUMAR; PANDEY, 2013; CUSHNIE; LAMB, 2005).

Alguns desses compostos, como hesperidina, quercetina, apigenina e luteolina, têm sua ação antiinflamatória e analgésica relatadas na literatura (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). O potencial dos flavonoides de intervir no processo inflamatório vem da capacidade de interferirem na função de sistemas enzimáticos responsáveis pela produção de mediadores necessários para o desenvolvimento dessa resposta. Comprovadamente, essas substâncias conseguem inibir a lipoxigenase e a ciclo-oxigenase indizível, proteínas responsáveis pela produção de leucotrienos, prostaglandinas e óxido nítrico, bem como algumas quinases através da competição pelo sítio catalítico dessas enzimas (WANG *et al.*, 2020).

3.4 Docking molecular e sua relevância na investigação de novos fármacos

Estudos *in silico* propiciam estimativas de energia de afinidade entre um ligante e uma proteína, antes mesmo que sejam sintetizados. Os custos para o desenvolvimento dessas pesquisas são consideravelmente inferiores se comparadas aos gastos laboratoriais necessários para produzir e testar farmacologicamente uma gama de substâncias. Desta forma, o *docking*

molecular tem sido uma ferramenta utilizada para filtrar compostos e delinear os candidatos com potencial de estabelecer interações com um alvo protéico de relevância biológica (RODRIGUES *et al.*, 2012).

A ancoragem molecular possibilita a obtenção das diferentes conformações e dinâmicas de interação, permitindo que o analista estabeleça qual é a mais provável de ocorrer com base nas menores energias livre de ligação apresentadas (KITCHEN *et al.*, 2004). Outra etapa fundamental para a performance de um ensaio de *docking* satisfatório se encontra no preparo dos ligantes, as moléculas devem ser projetadas mantendo disposições parecidas dos átomos da molécula primária. Através de varredura conformacional e alinhamento tridimensional com o ligante original podem ser propostas moléculas melhoradas (GOODARZI; FREITAS; FERREIRA, 2009).

A energia de afinidade entre receptor-ligante é promovida por meio de diferentes funções realizadas pelos pacotes computacionais de *docking*. Existem as funções baseadas em campo de força, o qual projeta uma representação física do sistema pesquisado e mimetiza o potencial de interação entre os átomos. As funções empíricas fazem uso de equações que utilizam coeficientes oriundos de otimizações pré-estabelecidas, enquanto que as funções baseadas em conhecimento fazem uso de informações vindas de estruturas determinadas experimentalmente para predizer as geometrias e conformações adotadas no acoplamento molecular (RODRIGUES *et al.*, 2012).

Espera-se que o uso contínuo desses ensaios promova o aprimoramento dos processos que ajudem a reduzir o tempo e os custos do desenvolvimento de novos fármacos, sobretudo para doenças que não possuem alternativas eficazes de tratamento, como é observado no COVID-19 (RODRIGUES *et al.*, 2012).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos alvos proteicos

As seguintes estruturas proteicas foram obtidas do repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) e utilizadas como alvos na investigação de acoplamento molecular, com base no estudo bibliográfico feito por Q. Almeida-Neto *et al.* (2020): a protease principal do COVID-19 (Mpro), a metiltransferase heterodímero NSP16 - NSP10 (Mt), a proteína SPIKE e a enzima conversora de angiotensina 2 humana (ACE2), totalizando três proteínas catalíticas e uma não-catalítica. A partir disso, as proteínas foram otimizadas para análise através da remoção de seus resíduos no programa USCF Chimera (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>).

A estrutura da protease principal do vírus COVID-19 foi identificada na base de dados como “*The crystal structure of COVID-19 main protease in complex with an inhibitor N3*” (PDB ID: 6LU7) Seu perfil cristalográfico foi depositado no Protein Data Bank com resolução de 2,16 Å, sendo determinado através da metodologia de difração de raio X. Ela se encontra complexada ao seu inibidor, o peptídeo N3, o qual interage covalentemente com o resíduo de cistina 145 presente na enzima (JIN *et al.*, 2020).

A conformação estrutural do complexo enzimático metiltransferase heterodímero NSP16 - NSP10 foi encontrada no Protein Data Bank como “*1.98 Å Resolution Crystal Structure of NSP16-NSP10 Heterodimer from SARS-CoV-2 in Complex with Sinefungin*” (PDB ID: 6WKQ). A estereoquímica da enzima foi realizada por difração de raio X, onde se obteve uma resolução de 1,98 Å. A proteína está associada à molécula de sinefungina, um inibidor em potencial descrito na literatura por sua similaridade com a S-adenosilmetionina, que atua como cofator dessa metilase (ROSAS-LEMUS *et al.*, 2021).

Os dados referentes as estruturas da proteína SPIKE e da enzima ACE2 foram extraídas da base de dados com a identificação de “*Crystal structure of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound with ACE2*” (PDB ID: 6M0J). A cristalografia deteve uma resolução correspondente a 2,45 Å por difração de raio X (LAN *et al.*, 2020). Por estarem complexados, após a remoção dos resíduos foi realizada a dissociação do mesmo, gerando dois alvos proteicos de interesse, os quais foram utilizados nos ensaios de acoplamento em seguida.

4.2 Seleção dos ligantes

As estruturas moleculares dos flavonoides: apigenina (PubChem CID: 5280443), daidzeína (PubChem CID: 5281708), genisteína (PubChem CID: 5280961), hesperidina (PubChem CID: 10621), luteolina (PubChem CID: 5280445), miricetina (PubChem CID:

5281672), naringenina (PubChem CID: 932) e quercetina (PubChem CID: 5280343); e dos inibidores: N3 (PubChem CID: 6323191), sinefungina (PubChem CID: 65482) e lisinopril (PubChem CID: 5362119) foram extraídas do repositório PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Posteriormente, todas as moléculas foram otimizadas para sua conformação 3D sendo plotadas no software de licença acadêmica MarvinSketch® versão 20.13 do pacote de softwares Marvin da ChemAxon© (<https://chemaxon.com/products/marvin>). Os arquivos foram salvos no formato .mol2 e submetidos aos ensaios de *docking* molecular juntamente com os alvos proteicos em formato .pdb.

4.3 Predição da interação molecular

O SwissDock consiste em um servidor web de implementação baseada em tecnologias de código aberto (Apache web server, PHP), capaz de gerar modelos computacionais de interação entre uma molécula pequena e um alvo proteico de interesse biológico. Dispõe de uma interface limpa e intuitiva que permite a utilização de ligantes e proteínas que podem ser preparados automaticamente. Todos os cálculos são performados no servidor, de forma que as operações de acoplamento não exigem muitos recursos de processamento computacional do usuário.

Este servidor é baseado no software de acoplamento molecular EADock DSS, tendo seu algoritmo definido nas seguintes etapas (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011). Primeiramente, um número diverso de simulações é gerado (variando de 5.000 a 15.000) a partir de uma região determinada pelo usuário ou nas proximidades da cavidade – alvo envolvendo toda a superfície proteica. Simultaneamente as energias de CHARMM (no contexto da modelagem molecular, são uma forma funcional de energia e a um conjunto de parâmetros responsáveis pela modelagem e cálculo de energia do sistema) são estimadas em uma rede (BROOKS *et al.*, 2009).

Em seguida, as simulações com as energias mais favoráveis são classificadas, considerando o efeito solvente através do modelo de solvatação implícita FACTS e agrupadas (HABERTHÜR; CAFLISCH, 2008). Finalmente os grupos mais favoráveis são dispostos no arquivo de resultado que pode ser analisado por ferramentas web ou baixado e interpretado em programas como o USCF Chimera.

Desta forma, os ensaios de *docking* molecular foram executados na plataforma online *Swissdock* (<http://www.swissdock.ch/>), inserindo as combinações de alvos proteicos e

flavonoides. Os inibidores previamente eliminados das estruturas na etapa de remoção dos resíduos, foram submetidos a um *redocking* utilizando os alvos otimizados. As simulações foram baixadas da plataforma em um arquivo .zip, sendo submetidas a uma análise prévia no software USFC Chimera. Os modelos de acoplamento com o menor valor de energia de ligação livre tiveram seus. pdbs salvos e exportados ao software Discovery Studio para a caracterização dos tipos de interação moleculares presentes entre ligantes e alvos.

Para avaliar a qualidade das interações como satisfatórias, os resultados de energia livre de ligação (ΔG) inferiores a -6,0 Kcal/mol foram considerados (Q. ALMEIDA-NETO *et al.*, 2020). Com base nas interações moleculares entre os flavonoides e as proteínas, as ligações de hidrogênio foram classificadas de acordo com estudos anteriores que agrupam interações com distâncias entre 2,5 e 3,1 Å como fortes, de 3,1 e 3,55 Å como média e interações maiores que 3,55 Å como fracas (IMBERTY, *et al* 1991).

Para as análises envolvendo o acoplamento alvo-ligante tridimensional e a dinâmica das interações em 2D foram selecionados os quatro flavonoides que apresentaram maiores variações de ΔG de modo comparativo entre os alvos selecionados.

5 RESULTADOS

A partir das simulações de acoplamento molecular, foram obtidos resultados referentes às energias de afinidade e regiões de interação entre os flavonoides e os alvos proteicos: Mpro, Mt, SPIKE e ACE2. Em adição, ensaios *in silico* envolvendo os inibidores da enzima (N3, sinefungina e lisinopril) foram efetuados para fins comparativos conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 – Valores de energia livre de ligação apresentado pelas reações dos flavonoides com os alvos proteicos

Mpro		Mt	
Molécula	ΔG (kcal/mol)	Molécula	ΔG (kcal/mol)
N3*	-8,84	Sinefungina*	-8,91
Hesperidina	-8,52	Hesperidina	-9,58
Miricetina	-7,81	Miricetina	-8,41
Quercetina	-7,64	Quercetina	-7,95
Luteolina	-7,39	Naringenina	-7,84
Genisteína	-7,38	Luteolina	-7,78
Apigenina	-7,20	Genisteína	-7,59
Naringenina	-7,10	Apigenina	-7,39
Daidzeína	-7,04	Daidzeína	-7,04
ACE2		SPIKE	
Molécula	ΔG (kcal/mol)	Molécula	ΔG (kcal/mol)
Lisinopril*	-8,52	Hesperidina	-8,90
Hesperidina	-9,05	Luteolina	-7,86
Miricetina	-7,18	Miricetina	-7,67
Quercetina	-7,09	Quercetina	-7,50
Luteolina	-7,07	Apigenina	-7,44
Naringenina	-6,97	Naringenina	-7,22
Apigenina	-6,74	Genisteína	-7,16
Daidzeína	-6,67	Daidzeína	-7,08
Genisteína	-6,65		

Fonte: Elaborado pelo autor (USCF Chimera). Legenda: *Inibidores. ΔG = energia livre de ligação.

Todos os valores de energia livre de interação apresentados foram considerados satisfatórios, destacando principalmente a hesperidina que demonstrou uma energia de afinidade superior ao dos inibidores das enzimas metiltransferase (mt) e ACE2 e próximo ao valor do inibidor da proteinase principal (Mpro). De uma forma geral, os flavonoides que se destacaram nesta etapa das análises foram a hesperidina, a miricetina, a quercetina, a luteolina e a naringenina, especificamente no seu acoplamento com a Mt, permanecendo entre os quatro compostos com os melhores valores de energia de afinidade.

5.1 Interação entre as moléculas de flavonoides e a proteinase principal (Mpro)

Após as simulações de *docking* molecular entre os quatro flavonoides selecionados (hesperidina, miricetina, quercetina e luteolina) e o alvo proteico em questão, ficou evidenciado que hesperidina e o N3 compartilham do mesmo sítio de interação, enquanto as demais moléculas se acoplam em um sítio semelhante da enzima e distinto do inibidor, conforme ilustrado na figura 4.

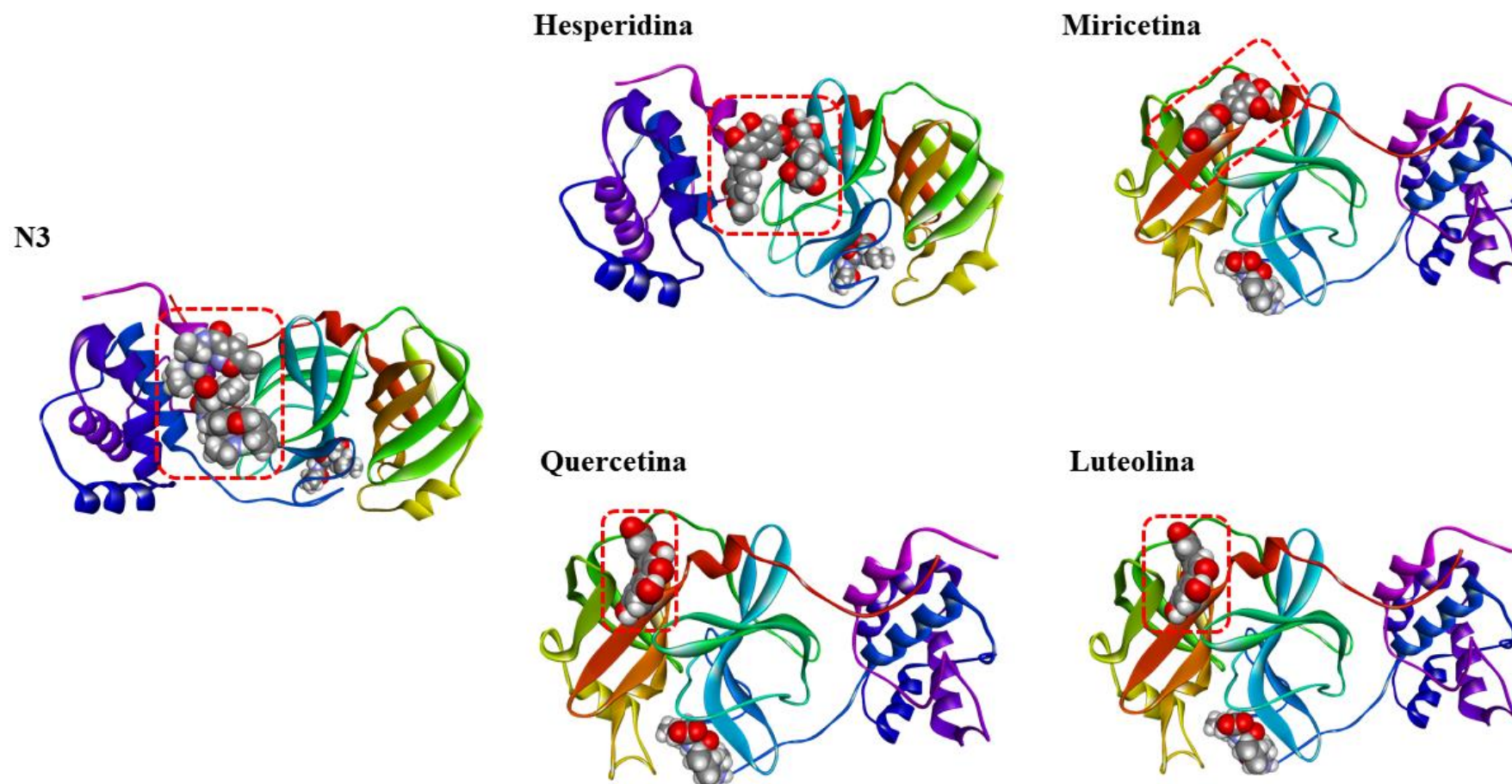
Com o intuito de examinar e descrever as características intrínsecas dos acoplamentos demonstrados na imagem, as interações químicas individuais envolvendo as estruturas moleculares com os resíduos de aminoácidos da proteinase principal foram analisadas e dispostas na tabela 2, utilizando o composto N3 como controle. Complementarmente, a natureza química dessas interações encontra-se ilustrada na figura 5.

Tabela 2 – Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da enzima Mpro.

Resíduo/ Ligante	N3	Hesperidina	Miricetina	Quercetina	Luteolina
ILE249	5,09	4,53			
PRO293	2,47*; 5,18	2,67*			
PHE294	4,72; 4,82	4,68			
ARG105		2,76*			
SER158		2,34*			
ASP153		3,01*			
GLN110		4,82			
GLU14			1,94*; 2,05*		
PRO112			5,17*		
LYS97			2,47*	4,47; 5,40	4,47; 5,46
GLY71			2,39*		
ALA70			2,64*	3,01*; 4,18; 4,82	3,01*; 4,18; 4,77
GLN69			3,09*		
ASN95				2,06*	2,10*
ASN119				2,23*	2,26*
SER121				3,06*	3,02*

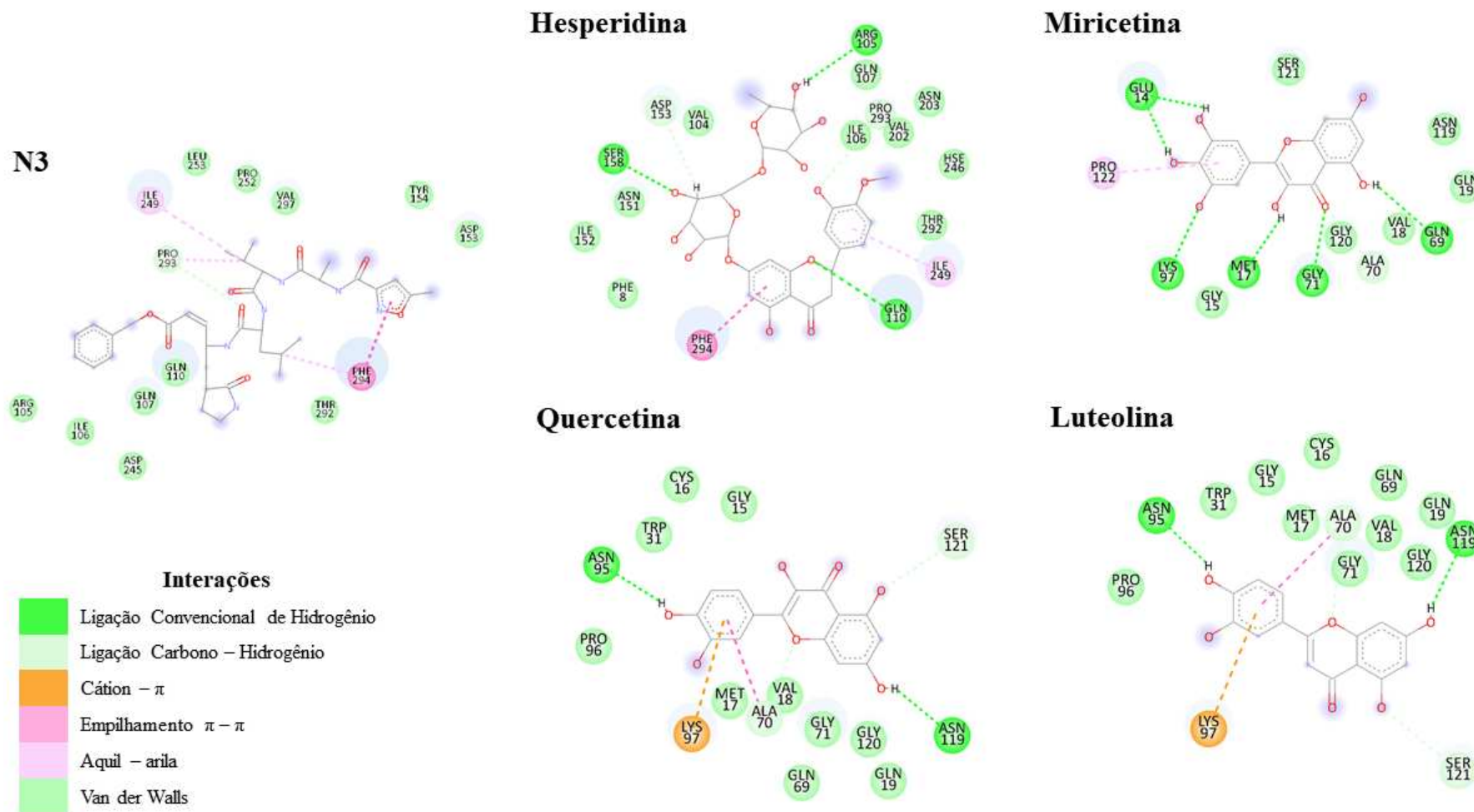
Fonte: Elaborado pelo autor (Discovery Studio). Legenda: *Interações de Hidrogênio. ILE = isoleucina; PRO = prolina; PHE = fenilalanina; ARG = arginina; SER = serina; ASP = aspartato; GLN = glutamina; GLU = glutamato; LYS = lisina; ALA = alanina; GLY = glicina; ASN = asparagina.

Figura 4 – Interações teóricas entre o inibidor N3 e os flavonóides com a enzima Mpro



Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio).

Figura 5 – Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e inibidor N3 com a enzima Mpro.



Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio). Legenda: ILE = isoleucina; PRO = Prolina; PHE = fenilalanina; ARG = arginina; SER = serina; ASP = aspartato; GLN = glutamina; GLU = glutamato; LYS = lisina; ALA = alanina; GLY = Glicina; ASN = asparagina.

Foi possível constatar que hesperidina interage com o alvo nos mesmos resíduos que o controle (ILE249, PRO293 e PHE294), estabelecendo ligações de hidrogênio nos resíduos ARG105, SER158 e ASP153. Além disso, apresentou interações do tipo alquil – arila, empilhamento $\pi - \pi$ e van der Waals, também constatadas no acoplamento da Mpro com o N3.

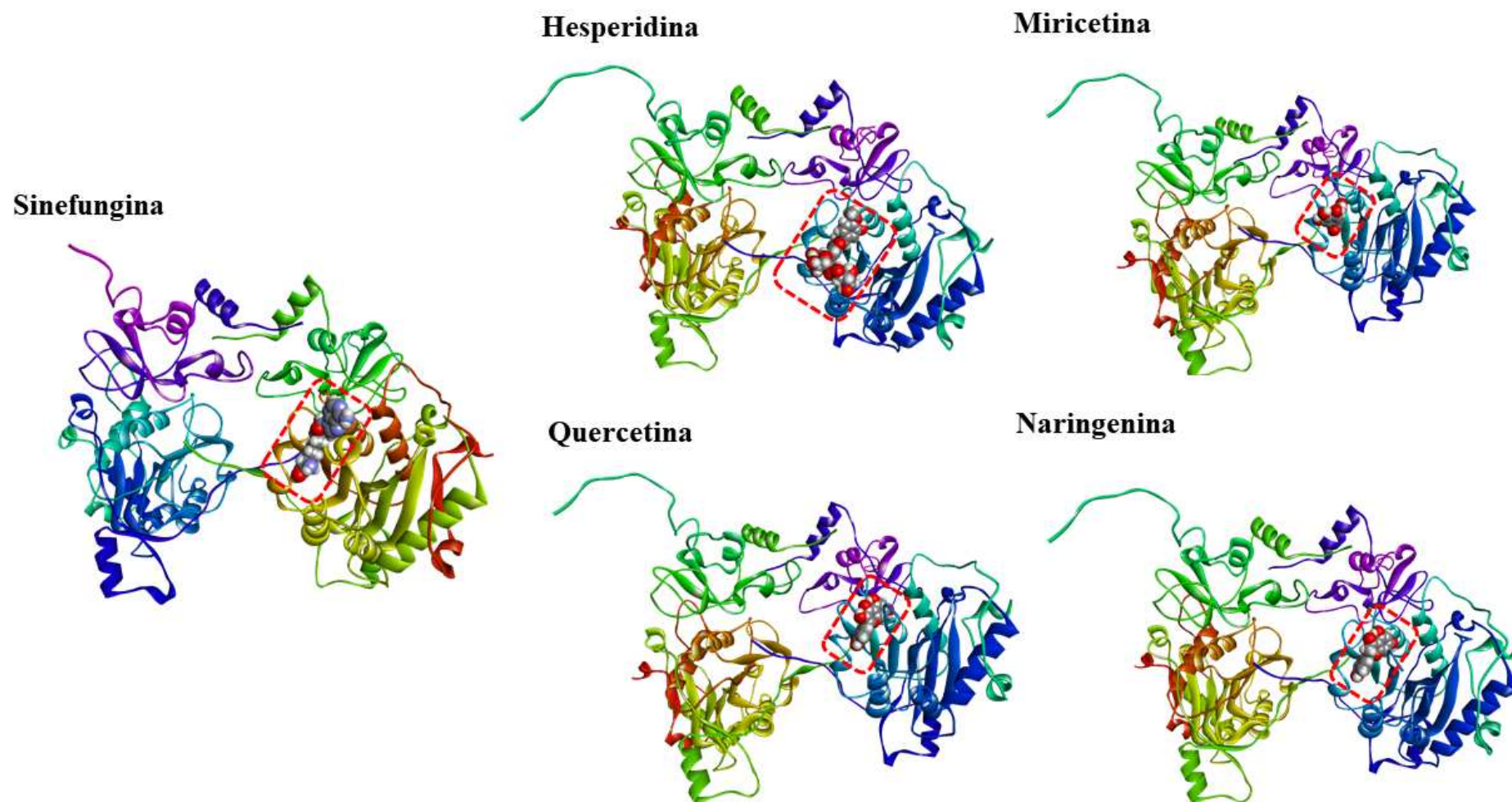
A miricetina por sua vez apresentou seis interações de hidrogênio fortes, compartilhando os mesmos sítios de acoplamento com a quercetina e luteolina nos resíduos LYS97 e ALA70. Por sua vez, estes dois flavonoides apresentaram quatro ligações fortes de hidrogênio, sendo três destas nos mesmos resíduos de aminoácido (ASN95, ASN119, SER121). Ademais, quercetina e luteolina apresentaram interações do tipo cátion – π em seus respectivos acoplamentos.

5.2 Interação entre as moléculas de flavonoides e a metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10 (Mt).

Os ensaios de acoplamento permitiram evidenciar que os flavonoides aqui testados (hesperidina, miricetina, quercetina e naringenina) estabeleceram conexões no mesmo sítio enzimático que o composto sinefungina, conforma ilustrado na figura 6.

Com a intenção de caracterizar os aspectos intrínsecos das interações demonstradas na imagem, as conexões químicas individuais envolvendo as estruturas moleculares com os resíduos de aminoácidos da metiltransferase foram analisadas e dispostas na tabela 3, utilizando a sinefungina como controle. Em adição, o caráter químico dessas interações encontra-se ilustrada na figura 7.

Figura 6 – Interações teóricas entre o inibidor sinefungina e os flavonoides com a enzima metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10.



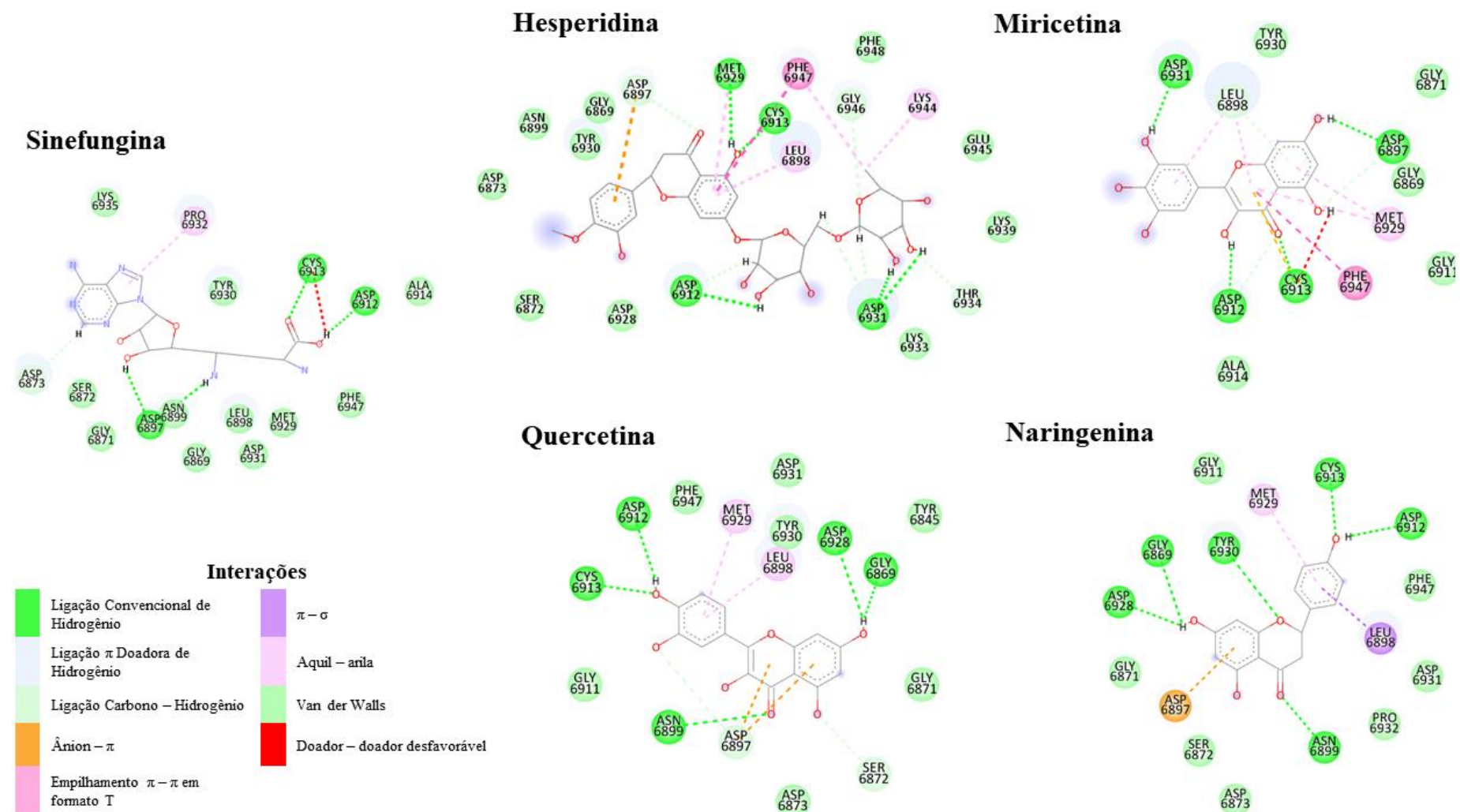
Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio).

Tabela 3 – Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da enzima metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10.

Resíduo/Ligante	Sinefungina	Hesperidina	Miricetina	Quercetina	Naringenina
ASP6897	2,12*; 2,74*	2,53*; 4,28	1,97*; 2,88*	2,71*; 3,38; 3,98	3,93
ASP6912	1,76*	2,02*; 2,66*	1,95*; 2,97*	2,78*; 2,82*	2,68*; 2,95*
ASP6928				2,41*; 3,00*	2,57*; 2,72*
ASP6931		1,98*; 2,36*; 2,45*; 2,88*	1,87*		
MET6929		3,01*; 5,13	4,70; 5,28	4,26	4,41
TYR6930					2,64*
CYS6913	2,24*; 2,53; 2,72*	2,02*; 2,84*	2,01*; 2,40*; 2,41; 5,67	2,12*	2,18*; 2,50*
LEU6898		4,29	3,29; 4,30; 4,46; 4,94	4,55	2,74
PHE6947		4,70; 5,43	5,43		
THR6934		2,84*			
GLY6869				3,04*	3,09*
GLY6946		2,50*			
LYS6944		4,59			
ASN6899				2,94*	2,94*
SER6872				2,71*	
PRO6932	4,47				

Fonte: Elaborado pelo autor (Discovery Studio). Legenda: *Interações de Hidrogênio. ASP = aspartato; MET = metionina; TYR = tirosina; CYS = cisteína; LEU = leucina; PHE = fenilalanina; THR = treonina; GLY = glicina; LYS = lisina; ASN = asparagina; SER = asparagina; PRO = prolina.

Figura 7 – Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e sinefungina com a enzima metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10.



Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio). ASP = aspartato; MET = metionina; TYR = tirosina; CYS = cisteína; LEU = leucina; PHE = fenilalanina; THR = treonina; GLY = glicina; LYS = lisina; ASN = asparagina; SER = asparagina; PRO = prolina.

Esses dados permitiram notar que os flavonoides são capazes de estabelecer interações nos mesmos resíduos de aminoácidos nos quais a sinefungina firma suas interações, sendo eles: ASP6897, ASP6912 E CYS6913.

A hesperidina apresentou maior energia de afinidade (-9,58 kcal/mol) que o controle (-8,91 kcal/mol), o que pode ser justificado por esse composto interagir com mais resíduos de aminoácidos que o inibidor, estabelecendo doze ligações de hidrogênio fortes além de conexões do tipo alquila, alquil – arila, empilhamento $\pi - \pi$ em formato T, ânion – π e força de van der Walls. A miricetina apresenta sete ligações de hidrogênio fortes, destacando a demonstrada no resíduo ASP6931, e a interação tipo empilhamento $\pi - \pi$ em formato T no resíduo PHE6947, uma vez que essas são regiões de acoplamento em comum da hesperidina com a metiltransferase.

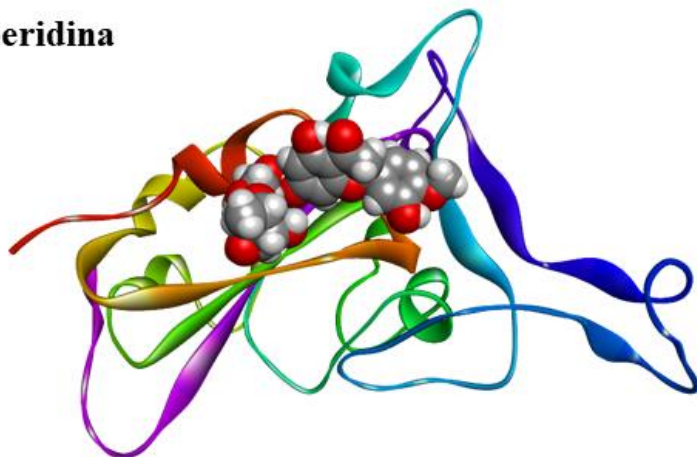
Quercetina e naringenina apresentam nove interações de hidrogênio fortes, compartilhando ligações desta natureza nos resíduos ASP6928, GLY6869 e ASN6899. De forma similar a miricetina e hesperidina, essas moléculas se acoplam nos resíduos MET6928, através de interações do tipo alquil – arila e LEU6898, destacando a interação $\pi - \sigma$ estabelecida exclusivamente pela naringenina neste sítio.

5.3 Interação entre as moléculas de flavonoides e a proteína SPIKE.

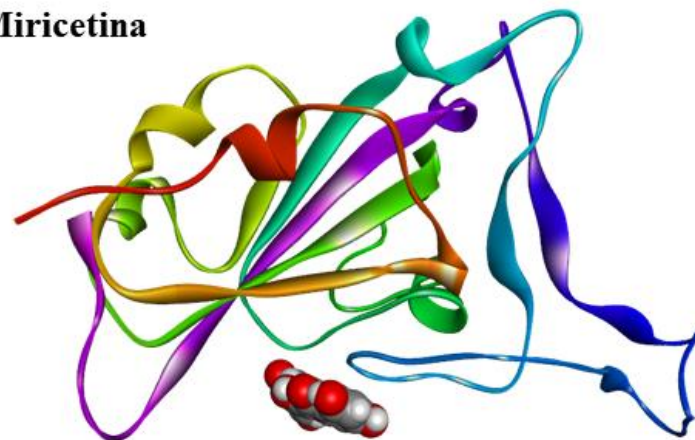
As simulações de *docking* molecular encontram-se demonstradas na figura 8 e demonstraram que quercetina e luteolina interagem com a proteína SPIKE no mesmo sítio, enquanto hesperidina e miricetina detêm regiões de acoplamento distintas no alvo.

Figura 8 – Interações teóricas entre os flavonoides e a proteína SPIKE.

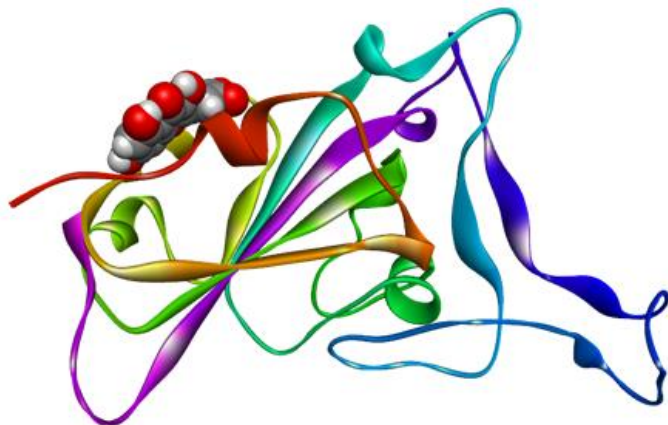
Hesperidina



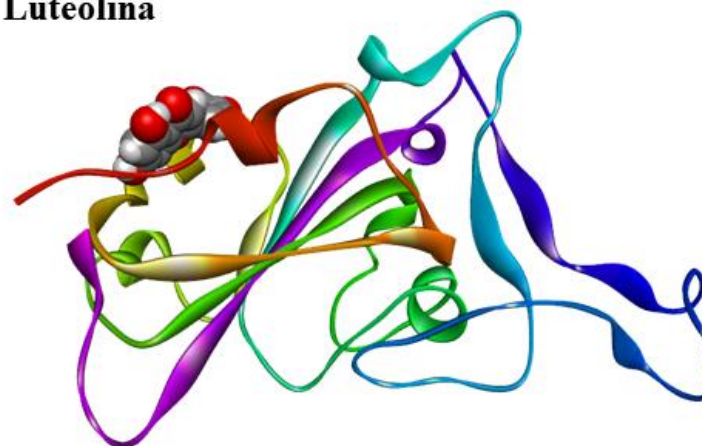
Miricetina



Quercetina



Luteolina



Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio)

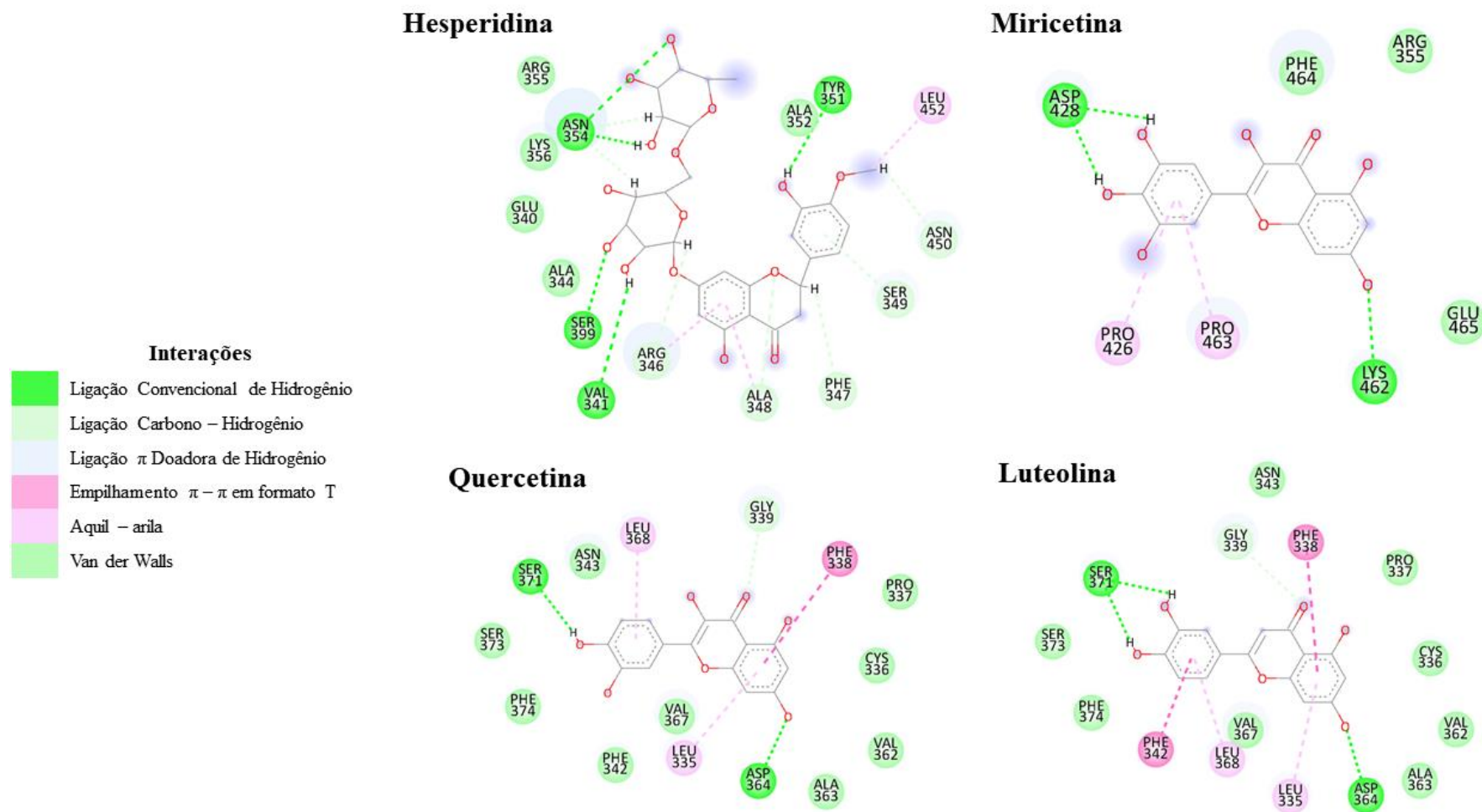
Com o objetivo de delinear os aspectos intrínsecos das interações demonstradas na imagem, as ligações químicas individuais envolvendo as estruturas moleculares com os resíduos de aminoácidos da proteína SPIKE foram analisadas e dispostas na tabela 4. Em adição, o caráter químico dessas interações encontra-se ilustrado na figura 9.

Tabela 4 – Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da proteína SPIKE.

Resíduo/Ligante	Hesperidina	Miricetina	Quercetina	Luteolina
ASN354	2,48*; 2,50*; 2,53*; 2,54*			
TYR351	2,65*			
LEU335			5,36	5,28
LEU368			5,26	5,09
LEU452	4,11			
ASN450	2,67*			
GLY339			2,78*	2,70*
SER349	3,31			
SER371			2,04*	2,01*; 2,05*
SER399	2,28*			
PHE338			5,75	5,75
PHE342				5,91
PHE347	2,86*			
ALA348	2,64*; 5,35			
ARG346	2,06*; 5,06			
VAL341	3,03*			
ASP364			2,05*	1,99*
ASP428		1,83*; 1,84*		
PRO426		4,84		
PRO463		4,87		
LYS462		2,31*		

Fonte: Elaborado pelo autor (Discovery Studio). Legenda: *Interações de Hidrogênio. ASN = asparagina; TYR = tirosina; LEU = leucina; GLY = glicina; SER = serina; PHE = fenilalanina; ALA = alanina; ARG = arginina; VAL = valina; ASP = aspartato; PRO = prolina; LYS = lisina.

Figura 9 – Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e com a proteína SPIKE.



Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio). Legenda: ASN = asparagina; TYR = tirosina; LEU = leucina; GLY = glicina; SER = serina; PHE = fenilalanina; ALA = alanina; ARG = arginina; VAL = valina; ASP = aspartato; PRO = prolina; LYS = lisina.

O ótimo valor de energia de afinidade apresentado pela hesperidina pôde ser justificado pela presença de dez ligações de hidrogênio fortes e interações do tipo alquil – arila. A miricetina apresentou o mesmo padrão de interações químicas que este flavonoide, apesar de estabelecer acoplamento em resíduos de aminoácidos distintos e três ligações de hidrogênio fortes, quantidade também observada para as simulações da quercetina.

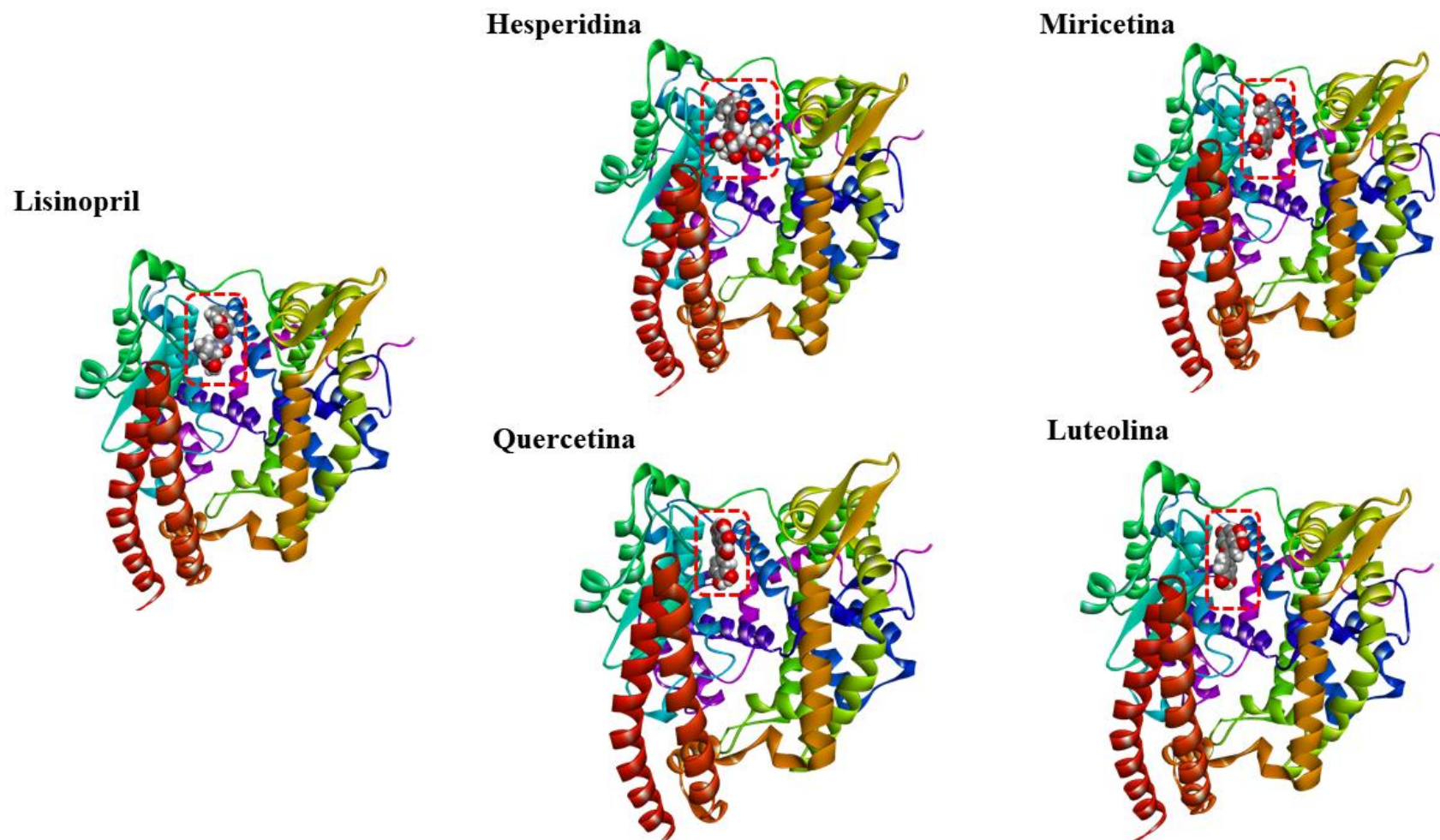
A luteolina demonstrou um melhor valor de energia livre de ligação quando comparada a miricetina e quercetina provavelmente por estabelecer quatro ligações de hidrogênio e, além da interação tipo alquil – arila, duas interações tipo empilhamento $\pi - \pi$ em formato T. Ressalta-se ainda que luteolina e quercetina compartilham de um padrão de acoplamento nos resíduos de aminoácido GLY339, SER371 e ASP364.

5.4 Interação entre as moléculas de flavonoides e a enzima conversora de angiotensina humana 2 (ACE2).

Após as simulações de acoplamento entre os quatro flavonoides selecionados (hesperidina, miricetina, quercetina e luteolina) e o alvo proteico em questão, ficou demonstrado todos os ligantes testados compartilham do mesmo sítio de ligação que o inibidor enzimático conhecido, o lisinopril, conforme ilustrado na figura 10.

Com o intuito de examinar e descrever as características intrínsecas dos *dockings* demonstrados na imagem, as interações químicas individuais envolvendo as estruturas moleculares com os resíduos de aminoácidos da ACE2 foram analisadas e dispostas na tabela 5, utilizando o composto lisinopril como controle. Em adição, a natureza química dessas interações encontra-se ilustrada na figura 11.

Figura 10 – Interações teóricas entre o inibidor lisinopril e os flavonoides com a ACE2.



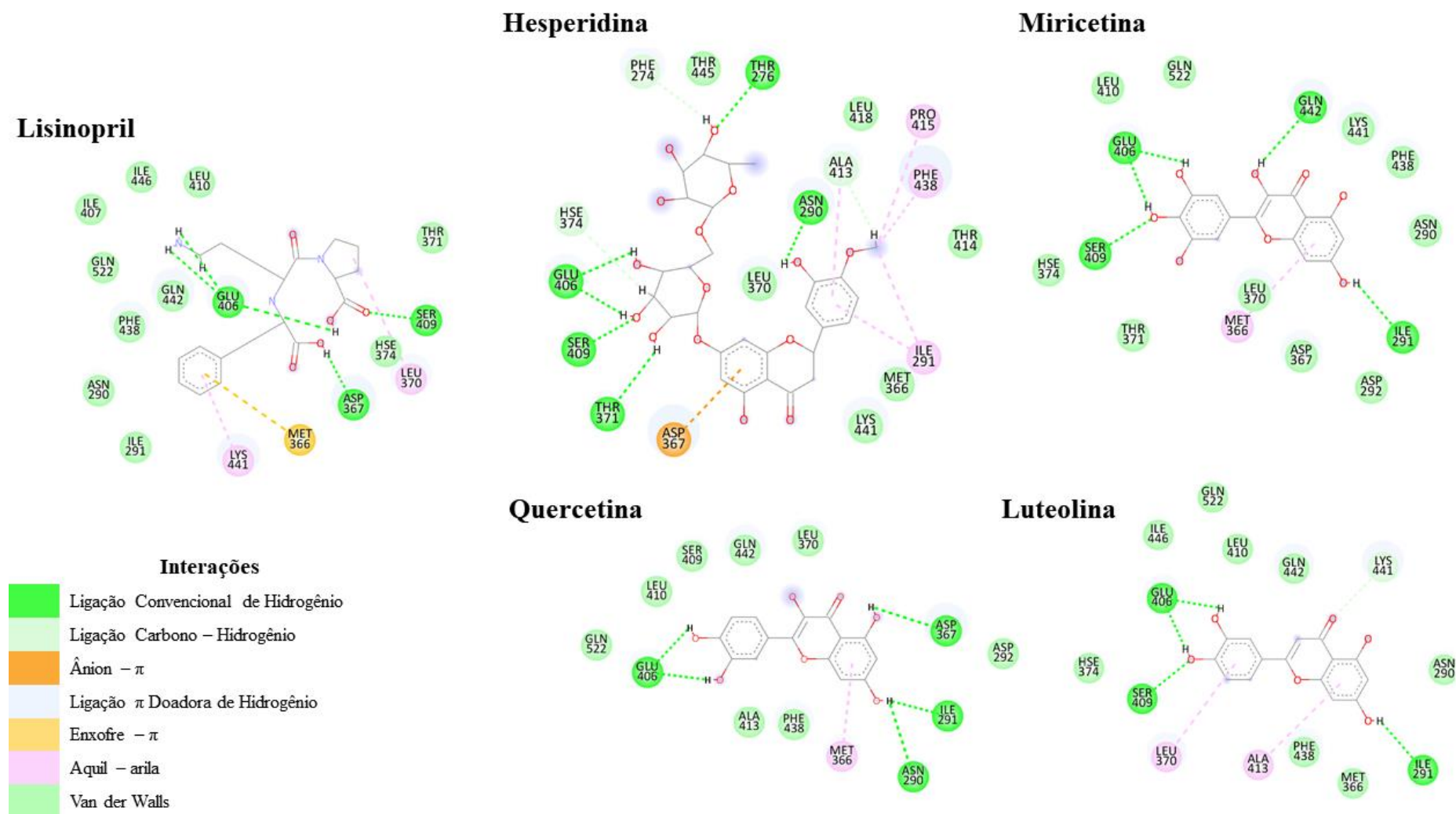
Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio).

Tabela 5 – Distâncias de interação (Å) entre os compostos e os resíduos de aminoácidos da enzima ACE2.

Resíduo/Ligante	Lisinopril	Hesperidina	Miricetina	Quercetina	Luteolina
GLU406	1,84*; 1,92*; 2,13; 2,71*; 3,09*	2,05*; 2,05*	1,85*; 1,95*	1,90*; 1,99*	1,83*; 1,86
SER409	2,16*	2,29*	2,17*		2,19*
LEU370	5,16				5,48
ASP367	1,77*	3,82		2,58*	
MET366	5,54		5,36	4,94	
LYS441	5,32				2,57*
PHE274		2,61			
THR276		2,20*			
THR371		2,83*			
ASN290		1,87*		3,06*	
ALA413		2,56*; 4,93			5,43
PRO415		4,32			
PHE438		4,06			
ILE291		4,53; 5,25	2,58*	2,01*	2,91*
HSE374		2,84*			
GLN442			2,30*		

Fonte: Elaborado pelo autor (Discovery Studio). Legenda: *Interações de Hidrogênio. GLU = glutamato; SER = serina; LEU = leucina; ASP = aspartato; MET = metionina; LYS = lisina; PHE = fenilalanina; THR = treonina; ASN = asparagina; ALA = alanina; PRO = prolina; ILE = isoleucina; GLN = glutamina; HSE = histidina

Figura 11 – Mapa bidimensional das interações moleculares dos flavonoides e lisinopril com a enzima ACE2.



Fonte: Elaborado pelo autor (Biovia Discovery Studio). GLU = glutamato; SER = serina; LEU = leucina; ASP = aspartato; MET = metionina; LYS = lisina; PHE = fenilalanina; THR = treonina; ASN = asparagina; ALA = alanina; PRO = prolina; ILE = isoleucina; GLN = glutamina; HSE = histidina

A hesperidina apresentou maior energia de afinidade (-9,05 kcal/mol) que o controle (-8,52 kcal/mol), o que pode ser justificado por esse composto interagir com mais resíduos de aminoácidos que o inibidor, estabelecendo oito ligações de hidrogênio fortes, duas a mais que o lisinopril. Além disso, firma conexões do tipo alquila, alquil – arila, ânion – π e força de van der Waals, ligações estas também observadas no acoplamento do controle com a enzima testada. Este flavonóide foi capaz de performar interações nos resíduos GLU406, SER409 e ASP367 de forma semelhante ao inibidor, bem como compartilha o padrão de *docking* presente nos outros flavonoides, principalmente o observado no resíduo ILE291.

Miricetina e quercetina apresentam cinco ligações de hidrogênio fortes e uma interação do tipo alquil – arila no resíduo MET366, a qual é observada no acoplamento do lisinopril. A luteolina estabelece quatro ligações fortes de hidrogênio, sendo capaz de firmar conexões nos resíduos LEU370 e LYS441 de forma semelhante ao controle, como também no resíduo ALA413 de maneira similar a hesperidina.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi capaz de caracterizar o perfil de interação das moléculas de flavonoides perante alvos proteicos de grande relevância no contexto da infecção pelo SARS-COV-2, levando em consideração os dados referentes às energias de afinidade demonstradas como a natureza química presente em cada acoplamento realizado.

O N3 e seus análogos são descritos como inibidores de amplo espectro para a Mpro, sendo utilizados em estudos preditivos de triagem e reposicionamento de fármacos anti-SARS-COV-2 (MACHADO; NICOLINI; NICOLINI 2020). Ademais, Yang *et al.* (2005) evidenciaram que este composto capaz de se ligar ao sítio catalítico da proteinase principal do SARS-COV, formado pelas subunidades P1, P1', P2, P3, P4, P5. Esse dado é relevante na busca de novas substâncias antivirais uma vez que as sequências proteicas presentes nas proteinases principais do SARS-COV e SARS-COV-2 são 96% idênticas e a região ativa de ambas as enzimas permanecem livres de mutações (KHAERUNNISA *et al.*, 2020).

Tomando como base os achados desse estudo, Jin *et al.* (2020) se propuseram a determinar a estrutura da proteinase principal do SARS-COV-2 e elencar seus inibidores em potencial. O N3 e seu análogo N1 se demonstram promissores, pois foram capazes de se ligar a Mpro de forma semelhante. A principal diferença no acoplamento destas duas moléculas com alvo se encontra na subunidade P1', enquanto a porção benzil éster do N3 adota uma certa conformação nesse sítio, a porção etil éster do N1 adquire uma conformação ligeiramente distinta.

A hesperidina apresentou o mesmo padrão de acoplamento que o composto N3 à proteinase principal, sendo capaz de estabelecer mais ligações de hidrogênio e interações com outros resíduos de aminoácidos presentes no sítio enzimático que o presente inibidor. Complementarmente, um estudo performado por Das *et al.* (2020) utilizando uma das cadeias que compõem a Mpro do SARS-COV-2 determinou que a hesperidina foi capaz de interagir com diversos aminoácidos que compõem o local ativo desta subunidade enzimática, como THR24, THR25, THR45, HIS4, SER46, CYS145, com uma energia de afinidade (-9.02 kcal/mol) superior àquela apresentada pelo fármaco antiviral indinavir (-8,84 kcal/mol). De forma semelhante, Chen *et al.* (2020) determinaram que a hesperidina é capaz de se ligar as diferentes cadeias da Mpro do SARS-COV-2 apresentando valores de energia de afinidade mais promissores que os antivirais lopinavir e ritonavir. Esses achados demonstram que a hesperidina é capaz de se ligar em diferentes sítios da Mpro, apresentando ótimas energias de afinidade quando comparadas a fármacos antivirais e inibidores conhecidos.

A luteolina é outro flavonóide que potencialmente atua por essa via antiviral. Os

ensaios de ancoragem molecular realizados por YU *et al.* (2020) demonstraram que a luteolina é capaz de interagir em um mesmo sítio que o N3 (formado principalmente pelos resíduos de aminoácidos THR25, LEU27, LEU4, VAL3 e ASN142), estabelecendo cinco ligações de hidrogênio, duas a mais que o inibidor. A energia de afinidade apresentada pelo flavonoide (-5.37 kcal/mol) também se mostrou mais promissora que o composto controle (-3.63 kcal/mol) indicando maior estabilidade no acoplamento a enzima quando comparada ao N3. Esse dado corrobora aos resultados apresentados no presente estudo, demonstrando que a luteolina é capaz de estabelecer interações em sítios distintos da enzima.

A literatura evidencia o potencial da miricetina e quercetina comparando sua performance de *docking* com fármacos antivirais. Um estudo realizado por Sharma *et al.* (2020) evidenciaram que tanto ambos os flavonoides são capazes de interagir com outro sítio da proteinase principal do SARS-COV-2 através de ligações de hidrogênio, nos resíduos de aminoácidos ASN142, GLY143, SER144, LEU141, CYS145, HIS41 e THR26 conforme também demonstrado para o controle ribavirin. Em termos de energia de afinidade, miricetina e quercetina apresentaram os valores de -6,15 e -6,58 kcal/mol, respectivamente. Esses dados são inferiores quando comparados aos resultados obtidos no presente estudo, mas ainda se encontram dentro do valor favorável de energia livre de ligação ($\Delta G > 6,0$ kcal/mol) e acima do valor evidenciado pelo inibidor ribavirin, atingindo -5,43 kcal/mol.

Outro alvo das terapias antivirais são as metiltransferases (Mtases), definidas como uma classe de enzimas que catalisam a transferência de um grupo metila do seu cofator S-adenosil-metionina (SAM) para seus substratos, sendo peças – chave na regulação epigenética através da metilação do DNA e RNA, maturação do RNA mensageiro (CAI; KAPILASHRAMI; LUO, 2016). Especificamente, as moléculas que ganham destaque nessa via de inativação são os análogos do SAM e análogos da S-adenosil-L-homocisteína (SAH), produto da reação de transmetilação dependente de SAM e reconhecido como inibidor de retroalimentação não-seletiva para uma infinidade de Mtases (ZHANG; ZHENG 2016).

A sinefungina é um dos principais representante dos análogos naturais do SAH, sendo originalmente isolada de culturas de *Streptomyces griseolus* (HIJIKATA, 2020). Especificamente, as metiltransferases codificadas por vírus envolvidas no processo de *capping* do RNA mensageiro apresentam maior sensibilidade a esse composto quando comparadas as demais Mtases, permitindo que este composto seja investigado como agente antiviral (ZHANG; ZHENG 2016). No contexto do SARS-COV-2 o mecanismo proposto para essa ação antiviral reside na capacidade dessa molécula se ligar ao sítio específico do SAM presente na subunidade NSP16, causando a supressão da atividade enzimática (CHEN; GUO, 2016).

Complementarmente, a sinefungina apresenta concentração inibitória média variando de 0,1 a 20 μ M para uma gama metriltransferases porém, demonstra baixa permeabilidade nas membranas celulares, provavelmente devido à metionina que lhe confere uma porção polar (COPELAND; SOLOMON; RICHON, 2009). Ademais, a toxicidade apresentada em modelos animais impediu sua aplicação terapêutica imediata, sendo principalmente usada de forma experimental (COPELAND, 2012; KURODA *et al.*, 2019).

O presente trabalho demonstrou que a sinefungina e os flavonoides testados foram capazes de estabelecer interações com o complexo NSP16 – NSP10, compartilhando os mesmos resíduos de aminoácidos com energias de afinidade favoráveis. Corroborando com esse achado, o estudo desenvolvido Tazikeh-Lemeski *et al.* (2020) determinou que alguns medicamentos antivirais e antiinflamatórios estabelecem ligações de hidrogênio nos mesmos resíduos de aminoácidos que os flavonoides, definindo um padrão de acoplamento compartilhado por essas moléculas no sítio catalítico da enzima.

Os valores de energia de afinidade apresentados pelos flavonoides foram ainda mais promissores do que aqueles demonstrados pelos antivirais. Por exemplo, a hesperidina apresentou um valor superior de ΔG em relação ao maviroc, o fármaco de melhor performance nos testes. Miricetina, quercetina e naringenina por sua vez, apresentaram melhores resultados quando comparados aos compostos fivapiravir, didanosine e prednisolona. Desta forma, estes resultados apontam os flavonoides como inibidores em potencial do complexo NSP16-NSP10 metiltransferase do SARS-COV-2, sendo uma alternativa a sinefungina e demais agentes antivirais que apresentem muitos efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade. (Tazikeh-Lemeski *et al.*, 2020).

Dentro do contexto da infecção por SARS-COV-2 várias pesquisas envolvendo novas abordagens terapêuticas têm sido direcionadas para a investigação de moléculas capazes de interferir da ligação da proteína SPIKE com a enzima conversora de angiotensina 2 ou bloquear o sítio catalítico da mesma, impedindo o processo infeccioso do vírus (BASU; SARKAR; MAULIK, 2020).

O lisinopril é um fármaco inibidor da ACE2, amplamente utilizado para o tratamento da hipertensão e hipertensão renovascular, em monoterapia ou associado a outras classes de agentes anti-hipertensivos (TSAI *et al.*, 2017). Segundo Khelfaoui *et al.* (2020), este medicamento é capaz inativar tanto a enzima como ao complexo formado entre esta proteína transmembrana e a SPIKE de forma mais efetiva que a cloroquina e hidroxicloroquina,

permitindo a utilização desse composto como controle na pesquisa de novas moléculas com potencial inibitório.

O presente estudo demonstrou que a hesperidina interage no mesmo sítio de ligação do lisinopril, apresentando uma energia de afinidade superior, bem como dentre todos os flavonoides testados foi a que apresentou melhor energia livre de ligação com a proteína SPIKE.

Os trabalhos de Utomo *et al.* (2020) e Tallei *et al.* (2020) evidenciaram o caráter antiviral da hesperidina ao estabelecer que a energia de afinidade apresentada por essa molécula varia de -8,3 a -9,6 kcal/mol dependendo do sítio de interação adotado. Ademais, a hesperidina é capaz de se ligar a ACE2 nos resíduos de ASN63, ALA71, LYS74 e SER44 de forma a mudar a conformação desta e desestabilizar a interação da proteína SPIKE com seu receptor. O mesmo estudo comprova que o flavonoide ainda é capaz de estabelecer ligações com outra região da proteína SPIKE apresentando um ótimo valor de afinidade, demonstrada pelos resíduos VAL472, GLY474, GLY471, PHE475, GLU473. Esses dados em conjunto com os resultados apresentados por essa pesquisa predizem o potencial da molécula de hesperidina como ótimo antiviral no combate a infecção por SARS-COV-2. receptor (BASU; SARKAR; MAULIK, 2020).

Corroborado com os resultados relatados nesta pesquisa, Pandey *et al.* (2020) determinaram que quercetina e luteolina apresentaram energias de afinidade iguais a -8,5 e -8,2 kcal/mol respectivamente, sendo capazes de interagir com o domínio S2 da proteína SPIKE. Este sítio é distinto do descrito nesse presente estudo e é composto pelos resíduos de aminoácidos ILE870, ASP867, ALA1056, PRO1057, GLY1059, HIS1058, SER730, MET730, MET731, LYS733, VAL860, LEU861, PRO863. Complementarmente, Maurya *et al.* (2020) determinaram outro sítio de interação da quercetina e luteolina na proteína SPIKE, abrangendo os resíduos GLN314, ASN764, ARG765, THR768, bem como na enzima ACE2, definido pelos resíduos TYR385, GLU398, HIS401, GLU402.

A miricetina manteve um padrão de acoplamento à ACE2 semelhante ao apresentado pela quercetina, demonstrando cinco ligações de hidrogênio e energia de afinidade igual a -7,18 kcal/mol, sendo que literatura relata que a energia livre de ligação oriunda da interação entre miricetina e ACE2 pode chegar até -8,9 kcal/mol (NGWA *et al.*, 2020). É destacado também o papel deste flavonoide como potente inibidor da helicase do SARS-COV, uma vez que é capaz de se encaixar e interagir diretamente com o sítio de acoplamento ATP/ADP presente nessa enzima, formado pelos resíduos N265, Y269 e R443 (YU *et al.*, 2012). Além disso, Singh *et al.* (2020) evidenciaram que tanto a hesperidina como a miricetina são capazes de interagir com outro alvo proteico do SARS-COV-2, a RNA polimerase RNA-

dependente (RdRp), apresentando ótimas energias de afinidade (-8,8 e -7,2 kcal/mol, respectivamente) e estabelecendo conexões com resíduos de aminoácidos que compõem a região catalítica da enzima.

Além dos resultados promissores frente os principais componentes proteicos da infecção mediada por SARS-COV-2, os flavonoides ainda apresentam ótimos relatos em estudos antivirais envolvendo outros patógenos.

A luteolina se demonstrou capaz de impedir a reativação do HIV-1 por bloquear a transativação de LTR conduzida por clades -B e -C-Tat (MEHLA; BIVALKAR-MEHLA; CHAUHAN, 2011). Ademais, o flavonoide conteve a reativação do vírus Epstein-Barr (EBV) nas células pela desregulação do fator de transcrição Sp1 vinculativo, como também inibiu a ação do enterovírus 71 e coxsackievirus A16 através do impedimento pronunciado da replicação do RNA viral (WILLIAMSON, 2010; XU, 2014). Além disso, esse composto demonstrou efeitos antivirais contra o rhesus rotavírus, o arbovírus Chickungunya (CHIKV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) (KNIPPING; GARSSSEN; VAN'T LAND, 2012; MURALI *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2016). Esse composto ainda evidenciou ação sinérgica com o kaempferol contra o HSV, a partir da observação que o composto própolis se mostrou mais ativo que as moléculas isoladas (IMANISHI *et al.*, 2002).

Já a quercetina, por administração oral, foi capaz de proteger camundongos da ação letal do vírus mengo, assim como demonstrou atividade antiviral dose-dependente contra o poliovírus tipo 1, herpes-vírus simples 1 e 2 (HSV-1, HSV-2) e o vírus sincicial respiratório (RSV) *in vitro* (LYU; RHIM; PARK, 2005; NINFALI *et al.*, 2020). Estudos recentes demonstram a ação efetiva que esse flavonoide possui contra um amplo espectro de cepas do vírus influenza, através da sua interação com a hemaglutinina presente nesses patógenos, inativando a fusão de células virais (WU *et al.*, 2015). Corroborando com esse achado, pesquisas *in silico* revelaram que esse composto pode ser um inibidor em potencial da neuraminidase dos vírus influenza A H1N1 e H7N9 (LIU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016). Ademais, a quercetina potencializou os efeitos da 5-etil-dioxiuridina e aciclovir contra a infecção por herpes simples (CARVALHO *et al.*, 2013; IMANISHI *et al.*, 2002).

A naringenina demonstrou ser capaz de reduzir a replicação e o efeito citopático da cepa neurovirulenta do vírus Sindbis *in vitro*, além de se mostrar eficiente no bloqueio das montagens das partículas do HCV e na inibição do alfavírus CHIKV em células Vero infectadas (PAREDES *et al.*, 2003; GOLDWASSER *et al.*, 2011; AHMADI *et al.*, 2016). Já a mirecetina ganhou destaque nos estudos envolvendo o HIV, pois foi possível evidenciar sua capacidade de

ligação e inibição da transcriptase reversa do HIV-1 e de reduzir a fixação do vírus às células-alvo (ORTEGA *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2018). A hesperidina, por sua vez, demonstrou um papel importante no controle da infecção por enterovírus 71 através de mecanismos antioxidantes (WANG *et al.*, 2015). Sua forma sulfonada também detém ação anti-herpética (GARG, 2005).

Os resultados até aqui descritos são advindos da capacidade dos flavonoides em estabelecer interações com os alvos proteicos virais culminando numa resposta efetiva contra esses patógenos. A natureza química dessas ligações tem grande impacto nessa resposta antiviral, sendo um dos principais fatores que corrobora para a eficácia da mesma.

Dentre os tipos de interações destacadas nesse estudo existem as ligações de hidrogênio, consideradas como as conexões não-covalentes mais relevantes nos sistemas biológicos (ARUNAN *et al.*, 2011). A energia associada a uma ligação de hidrogênio varia de 2 a 10 kcal mol⁻¹, sendo responsáveis por manter a estrutura das conformações das α – hélices e folhas β – pregueadas das proteínas e das bases purinas-pirimidinas dos ácidos nucleicos (CAMPBELL; FARREL, 2007). A literatura relata a importância dessas ligações para a ação de vários fármacos, como por exemplo, o saquinavir sobre o sítio catalítico da protease do HIV-1 e os compostos pirazolo-piridínicos e sobre algumas proteínas quinases (LIU *et al.*, 2008; LEUNG; ABBENANTE; FAIRLIE, 2000).

Outro componente que corrobora para o acoplamento molecular entre ligantes e alvos são as forças eletrostáticas, que podem variar energeticamente entre 1 e 7 kcal/mol (CHURCHILL; RUTLEDGE; WETMORE, 2010). Os anéis aromáticos presentes nos flavonoides e em alguns resíduos de aminoácidos notados nos alvos foram capazes de estabelecer conexões eletrostáticas do tipo dipolo-dipolo conhecidas como empilhamento amida - π , empilhamento π – π em forma de T, alquil – arila ou alternativamente interações íon-dipolo denominadas de cátion – π . Apesar de presente nos resultados, a literatura relata que a interação ânion – π raramente ocorre em sistemas biológicos, uma vez que as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos ricos em elétrons repelem cargas negativas próximas a suas nuvens π (EGLI; SARKHEL, 2007).

A relevância biológica dessas interações pode ser evidenciada na enzima β -cetoacil ACP sintetase, responsável por catalisar a condensação de Malonil-ACP com a cadeia de ácido graxo em formação através do estabelecimento de interações do tipo amida - π , empilhamento π – π em forma de T e empilhamento π com seu ligante (PAPPENBERGER *et al.*, 2007). Como

outro exemplo, foram observadas interações de empilhamentos π e T do grupo fenila do inibidor de aldose redutase com os grupos fenila de TRP111 e PHE122, que contribuem para sua estabilidade no sítio de catalítico da enzima (MCDONOUGH *et al.*, 2002). Complementarmente, as forças dipolares de um sistema de empilhamento π são de grande importância no reconhecimento molecular da tacrina (um fármaco utilizado no tratamento do alzheimer) pelo sítio catalítico da acetilcolinesterase (CHENG *et al.*, 2019). Ademais, esses tipos de empilhamento ainda estão envolvidos no processo de reconhecimento do mRNA cap por proteínas, na redução dos valores de pKa de resíduos importantes do sítio catalítico da enzima glutathione S-transferase (IBARRA; NIESLANIK; ATKINS, 2001).

Os empilhamentos amida- π se configuram como fatores importantes para a potência das interações, conforme demonstrado pelo estudo de Salonen *et al.* (2012), onde dois inibidores do fator X contendo um anel oxazola apresentam geometria de interação parecidas, mas com uma diferença de 11 vezes na afinidade apresentada justamente pela presença da interação amida- π .

Já as ligações alquil – arila podem ter um papel significativo na conformação e na estabilidade de estruturas de complexos, apresentando energias de afinidade que variam entre -1 a -5 kcal/mol (BRANDL *et al.*, 2001). A literatura traz que essas interações estão presentes no reconhecimento que englobam a produção de complexos de proteínas com cofatores ou ligantes, conforme é notado no grupamento heme, piridoxal-5-fosfato, nucleotídeos, carboidratos e peptídeos ligados (NISHIO *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que as interações cátion- π podem estabilizar as energias de interação em -2 a -5 kcal mol⁻¹, tornando-as competitivas com ligações de hidrogênio e interações entre pares de íons nas interações ligante-receptor e proteína-proteína (BISSANTZ; KUHN; STAHL, 2010). Um dos principais exemplos da aplicação desta interação nos sistemas biológicos se dá pela ligação da acetilcolina no sítio catalítico da acetilcolinesterase e na região de interação específica nos receptores nicotínicos, através da conexão cátion- π entre seu grupo amônio quaternário e um resíduo de triptofano (ZHONG *et al.*, 1998).

Já as forças de van der Waals se configuram como interações de grande importância para o processo de reconhecimento do ligante com determinado alvo proteico pois, apesar de envolverem fracas energias de interação isoladamente, se caracterizam por interações múltiplas, que somadas, contribuem significativamente para o saldo energético do acoplamento (KAUR *et al.*, 2008). Por exemplo, a losartana atua como antagonista dos receptores de angiotensina II

do subtipo 1 estabelecendo várias interações de van der Waals entre suas subunidades n-butila e bifênica com os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos localizados na bolsa lipofílica L1 (PHE182, PHE171 e ALA163) e com o resíduo VAL108 (BHUIYAN *et al.*, 2009).

Além disso, os dados apresentados por esse estudo podem nortear pesquisas envolvendo a relação estrutura-atividade dos flavonoides frente aos alvos proteicos da infecção por SARS-COV-2, uma vez que a literatura carece de fontes relacionadas a esse tema. Contudo, existem estudos que evidenciam a presença dessas características nas ações antiinflamatória, antioxidante e antiinflamatória apresentadas por esses compostos.

Sarian *et al.* (2017) destacaram que a atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura, sendo determinada pelos fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado; reatividade em frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. De forma geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade do agente de hidrogênio e de elétrons, de forma que flavonoides que apresentam diversos grupamentos OH como a quercetina, miricetina e luteolina, por exemplo, possuem forte atividade antioxidante.

Quando se trata da atividade antiinflamatória, a presença de glicosilações não é favorável. Kim *et al.* (2004) demonstraram que a presença de hidroxilas nas posições 3', 4', 5' e 7' são importantes, ao passo que a glicosilação desses grupos causa redução da atividade antiinflamatória. Complementarmente, outro exemplo que mostra a interferência da glicosilação na atividade anti-inflamatória focaliza quercetina, seu glicosídeo rutina, o flavonol morina e o glicosídeo hesperidina frente à formação de edema na pata de camundongo induzido por carragenina. Ainda é possível observar que as agliconas (quercetina e morina) apresentaram melhores resultados, enquanto que os flavonoides glicosilados não apresentaram atividade significativa. Esses resultados permitem observar que a lipofilicidade torna-se um importante fator (DINDA *et al.*, 2017).

De forma geral, a deslocalização de elétrons π gerada pela extensão de conjugação presente na estrutura dos flavonoides (carbonila cetônica em C4, ligação dupla C2-C3 e anel B) garante uma estabilidade favorável das espécies intermediárias geradas, o que incentiva as interações moleculares envolvidas (THEOHARIDES *et al.*, 2001; TROUILLAS *et al.*, 2006). Tais evidências são comprovadas através de estudos teóricos de modelagem molecular. Além disso, o grupamento catecol (1,2-di-hidróxifenil) no anel B possibilita a ocorrência de oxidação

enzimática, resultando na formação de espécies eletrofílicas do tipo quinona/semiquinona capazes de sofrer adição nucleofílica. Dessa forma, os flavonoides atuam como eletrófilos ligantes de macromoléculas, acarretando em reações que envolvam a formação de ligações covalentes entre flavonoides e alvos proteicos de interesse biológicos (RAWEL; ROHN; KROLL, 2003)

Desta forma, os resultados apresentados pelo presente estudo sugerem que os flavonoides podem inibir a interação do vírus com as células hospedeiras através da ligação a ACE2 ou proteína SPIKE. Além disso, os flavonoides apresentam afinidade por enzimas importantes em processos pós-traducionais, interferindo na replicação viral.

7 CONCLUSÃO

O emprego de metodologias *in silico* permitiram evidenciar as interações moleculares presentes entre os flavonoides e os principais alvos proteicos envolvidos na infecção por SARS-COV-2. Notou-se a capacidade teórica que esses compostos naturais têm de estabelecer fortes conexões no mesmo sítio de ligação de inibidores, exibindo ótimos valores de energia de afinidade. Destacou-se a versatilidade da flavanona hesperidina, capaz de se ligar no sítio inibitório de enzimas como a proteinase principal, a metiltransferase heterodímero NSP16-NSP10 e a ACE2 apresentando mais ligações de hidrogênio e melhores escores de energia livre de ligação que seus respectivos inibidores (N3, sinefungina e lisinopril). Esses resultados ilustram o potencial farmacológico teórico dos flavonoides, servindo de indicação para a viabilidade de testes em cultura de células. Enfatizando que o presente trabalho representa uma etapa essencial no processo de desenvolvimento de um medicamento baseado em flavonoides para o tratamento do COVID-19.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015
- AHMADI, A.; HASSANDARVISH, P.; LANI, R.; YADOLLAHI, P.; JOKAR, A.; BAKAR, S. A.; ZANDI, K. Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. **RSC Advances**, v. 6, n. 73, p. 69421–69430, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA16640G>.
- ARUNAN, E.; DESIRAJU, G. R.; KLEIN, R. A.; SADLEJ, J.; SCHEINER, S.; ALKORTA, I.; CLARY, D. C.; CRABTREE, R. H.; DANNENBERG, J. J.; HOBZA, P.; KJAERGAARD, H. G.; LEGON, A. C.; MENNUCCI, B.; NESBITT, D. J. Defining the hydrogen bond: An account (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 83, n. 8, p. 1619–1636, 8 jul. 2011. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-01-01>.
- ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, jul. 2020.
- BASU, A.; SARKAR, A.; MAULIK, U. Molecular docking study of potential phytochemicals and their effects on the complex of SARS-CoV2 spike protein and human ACE2. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 17699, dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74715-4>.
- BHUIYAN, M. A.; ISHIGURO, M.; HOSSAIN, M.; NAKAMURA, T.; OZAKI, M.; MIURA, S.; NAGATOMO, T. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. **Life Sciences**, v. 85, n. 3–4, p. 136–140, jul. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.05.001>.
- BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061–5084, 22 jul. 2010. <https://doi.org/10.1021/jm100112j>.
- BRANDL, M.; WEISS, M. S.; JABS, A.; SÜHNEL, J.; HILGENFELD, R. C-h $\cdots$ π -interactions in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 1, p. 357–377, mar. 2001. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4473>.
- BROOKS, B. R.; BROOKS, C. L.; MACKERELL, A. D.; NILSSON, L.; PETRELLA, R. J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.; CAFLISCH, A.; CAVES, L.; CUI, Q.; DINNER, A. R.; FEIG, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; HODOSCEK, M.; IM, W.; ... KARPLUS, M. CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 30 jul. 2009. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>
- CAI, X.-C.; KAPILASHRAMI, K.; LUO, M. Synthesis and Assays of Inhibitors of Methyltransferases. *Methods in Enzymology*. [S. l.]: **Elsevier**, 2016. v. 574, p. 245–308. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.01.009>.

CAMPBELL, M.K; FARRELL, S.O. Bioquímica, 5a Edição. **Editora Thomson**. 2008.

CARVALHO, O. V.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, C. G. T.; FERREIRA, H. C. C.; SANTOS, M. R.; DIAZ, M. A. N.; OLIVEIRA, T. T.; SOARES-MARTINS, J. A. P.; ALMEIDA, M. R.; SILVA JÚNIOR, A. In vitro inhibition of canine distemper virus by flavonoids and phenolic acids: Implications of structural differences for antiviral design. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 717–724, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.013>.

CERVIA, C.; NILSSON, J.; ZURBUCHEN, Y.; VALAPERTI, A.; SCHREINER, J.; WOLFENSBERGER, A.; RAEER, M. E.; ADAMO, S.; EMMENEGGER, M.; HASLER, S.; BOSSHARD, P. P.; DE CECCO, E.; BÄCHLI, E.; RUDIGER, A.; STÜSSI-HELBLING, M.; HUBER, L. C.; ZINKERNAGEL, A. S.; SCHAER, D. J.; AGUZZI, A.; ... BOYMAN, O. Systemic and mucosal antibody secretion specific to SARS-CoV-2 during mild versus severe COVID-19. preprint. [S. l.]: **Immunology**, 23 maio 2020. DOI 10.1101/2020.05.21.108308. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.21.108308>. Acesso em: 18 mar. 2021.

CHEN, H.; WANG, J.; SU, N.; BAO, X.; LI, Y.; JIN, J. Simplified immune-dysregulation index: a novel marker predicts 28-day mortality of intensive care patients with COVID-19. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1645–1647, ago. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06114-2>.

CHEN, Y. W.; YIU, C.-P. B.; WONG, K.-Y. Prediction of the SARS-CoV-2 (2019-nCoV) 3C-like protease (3CLpro) structure: virtual screening reveals velpatasvir, ledipasvir, and other drug repurposing candidates. **F1000Research**, v. 9, p. 129, 9 abr. 2020. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22457.2>.

CHEN, Y.; GUO, D. Molecular mechanisms of coronavirus RNA capping and methylation. **Virologica Sinica**, v. 31, n. 1, p. 3–11, fev. 2016. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3726-4>.

CHEN, Y.; SU, C.; KE, M.; JIN, X.; XU, L.; ZHANG, Z.; WU, A.; SUN, Y.; YANG, Z.; TIEN, P.; AHOLA, T.; LIANG, Y.; LIU, X.; GUO, D. Biochemical and Structural Insights into the Mechanisms of SARS Coronavirus RNA Ribose 2'-O-Methylation by nsp16/nsp10 Protein Complex. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. e1002294, 13 out. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002294>.

CHENG, Z.-Q.; ZHU, K.-K.; ZHANG, J.; SONG, J.-L.; MUEHLMANN, L. A.; JIANG, C.-S.; LIU, C.-L.; ZHANG, H. Molecular-docking-guided design and synthesis of new IAA-tacrine hybrids as multifunctional AChE/BChE inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 277–288, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.057>.

CHURCHILL, C. D. M.; RUTLEDGE, L. R.; WETMORE, S. D. Effects of the biological backbone on stacking interactions at DNA–protein interfaces: the interplay between the backbone... π and π ... π components. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 43, p. 14515, 2010. <https://doi.org/10.1039/c0cp00550a>.

COPELAND, R. A. Protein methyltransferase inhibitors as personalized cancer therapeutics. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 9, n. 2–3, p. e83–e90, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2011.08.001>.

COPELAND, R. A.; SOLOMON, M. E.; RICHON, V. M. Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p. 724–732, set. 2009. <https://doi.org/10.1038/nrd2974>.

CORONAVIRIDAE STUDY GROUP OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, abr. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.

Coronavírus Brasil. Disponível em: <<https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 11 fev. 2021.

Coronavirus Disease (COVID-19) – World Health Organization.

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acessado 11 de fevereiro de 2021.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, 2009. DOI 10.5935/1984-6835.20090024. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20090024>. Acesso em: 11 abr. 2021.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343–356, nov. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>.

DAFFIS, S.; SZRETTTER, K. J.; SCHRIEWER, J.; LI, J.; YOUN, S.; ERRETT, J.; LIN, T.-Y.; SCHNELLER, S.; ZUST, R.; DONG, H.; THIEL, V.; SEN, G. C.; FENSTERL, V.; KLIMSTRA, W. B.; PIERSON, T. C.; BULLER, R. M.; GALE JR, M.; SHI, P.-Y.; DIAMOND, M. S. 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 452–456, nov. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09489>.

DAI, W.; ZHANG, B.; JIANG, X.-M.; SU, H.; LI, J.; ZHAO, Y.; XIE, X.; JIN, Z.; PENG, J.; LIU, F.; LI, C.; LI, Y.; BAI, F.; WANG, H.; CHENG, X.; CEN, X.; HU, S.; YANG, X.; WANG, J.; ... LIU, H. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. **Science**, v. 368, n. 6497, p. 1331–1335, 19 jun. 2020. <https://doi.org/10.1126/science.abb4489>.

DAS, S.; SARMAH, S.; LYNDEN, S.; SINGHA ROY, A. An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–11, 13 maio 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1763201>.

DEL VALLE, D. M.; KIM-SCHULZE, S.; HUANG, H.-H.; BECKMANN, N. D.; NIRENBERG, S.; WANG, B.; LAVIN, Y.; SWARTZ, T. H.; MADDURI, D.; STOCK, A.; MARRON, T. U.; XIE, H.; PATEL, M.; TUBALLES, K.; VAN OEKELEN, O.; RAHMAN, A.; KOVATCH, P.; ABERG, J. A.; SCHADT, E.; ... GNJATIC, S. An inflammatory cytokine

signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature Medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636–1643, out. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>.

DENG, S.-Q.; PENG, H.-J. Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 575, 20 feb. 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9020575>.

DINDA, B.; DINDA, S.; DASSHARMA, S.; BANIK, R.; CHAKRABORTY, A.; DINDA, M. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 131, p. 68–80, maio 2017. .

DIURNO, F.; NUMIS, F. G.; PORTA, G.; CIRILLO, F.; MADDALUNO, S.; RAGOZZINO, A.; DE NEGRI, P.; DI GENNARO, C.; PAGANO, A.; ALLEGORICO, E.; BRESSY, L.; BOSSO, G.; FERRARA, A.; SERRA, C.; MONTISCI, A.; D'AMICO, M.; SCHIANO LO MORELLO, S.; DI COSTANZO, G.; TUCCI, A. G.; ... FACCHINI, G. Eculizumab treatment in patients with COVID-19: preliminary results from real life ASL Napoli 2 Nord experience. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 4040–4047, abr. 2020. https://doi.org/10.26355/eurev_202004_20875.

DUAN, K.; LIU, B.; LI, C.; ZHANG, H.; YU, T.; QU, J.; ZHOU, M.; CHEN, L.; MENG, S.; HU, Y.; PENG, C.; YUAN, M.; HUANG, J.; WANG, Z.; YU, J.; GAO, X.; WANG, D.; YU, X.; LI, L.; ... YANG, X. Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 17, p. 9490–9496, 28 abr. 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004168117>.

EGLI, M.; SARKHEL, S. Lone Pair–Aromatic Interactions: To Stabilize or Not to Stabilize. **Accounts of Chemical Research**, v. 40, n. 3, p. 197–205, mar. 2007. <https://doi.org/10.1021/ar068174u>.

FAN, W.; QIAN, S.; QIAN, P.; LI, X. Antiviral activity of luteolin against Japanese encephalitis virus. **Virus Research**, v. 220, p. 112–116, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.04.021>.

FISHER, D.; HEYMANN, D. Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 57, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01533-w>.

FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 1, p. 116–134, jan. 2007. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600173>.

GARG, A. Biological Activity Assessment of a Novel Contraceptive Antimicrobial Agent. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 3, p. 414–421, 1 maio 2005. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04181>.

GELERIS, J.; SUN, Y.; PLATT, J.; ZUCKER, J.; BALDWIN, M.; HRIPCSAK, G.; LABELLA, A.; MANSON, D. K.; KUBIN, C.; BARR, R. G.; SOBIESZCZYK, M. E.; SCHLUGER, N. W. Observational Study of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 25, p. 2411 – 2418, 18 jun. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2012410>.

GOODARZI, M.; FREITAS, M. P.; FERREIRA, E. B. Influence of Changes in 2-D Chemical Structure Drawings and Image Formats on the Prediction of Biological Properties Using MIA-QSAR. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 4, p. 458 – 464, abr. 2009. <https://doi.org/10.1002/qsar.200810146>.

GOLDWASSER, J.; COHEN, P. Y.; LIN, W.; KITSBERG, D.; BALAGUER, P.; POLYAK, S. J.; CHUNG, R. T.; YARMUSH, M. L.; NAHMIAS, Y. Naringenin inhibits the assembly and long-term production of infectious hepatitis C virus particles through a PPAR-mediated mechanism. **Journal of Hepatology**, v. 55, n. 5, p. 963–971, nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.011>.

GRALINSKI, L. E.; MENACHERY, V. D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 135, 24 jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/v12020135>.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2149–2159, 30 jul. 2011. <https://doi.org/10.1002/jcc.21797>.

GUO, Y.-R.; CAO, Q.-D.; HONG, Z.-S.; TAN, Y.-Y.; CHEN, S.-D.; JIN, H.-J.; TAN, K.-S.; WANG, D.-Y.; YAN, Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 11, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>.

HABERTHÜR, U.; CAFLISCH, A. FACTS: Fast analytical continuum treatment of solvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 701–715, 15 abr. 2008. <https://doi.org/10.1002/jcc.20832>.

HADJADJ, J.; YATIM, N.; BARNABEI, L.; CORNEAU, A.; BOUSSIER, J.; PÉRÉ, H.; CHARBIT, B.; BONDET, V.; CHENEVIER-GOBEAUX, C.; BREILLAT, P.; CARLIER, N.; GAUZIT, R.; MORBIEU, C.; PÈNE, F.; MARIN, N.; ROCHE, N.; SZWEBEL, T.-A.; SMITH, N.; MERKLING, S. H.; ... TERRIER, B. Impaired type I interferon activity and exacerbated inflammatory responses in severe Covid-19 patients. preprint. [S. l.]: **Infectious Diseases (except HIV/AIDS)**, 23 abr. 2020. DOI 10.1101/2020.04.19.20068015.

HASSAN, S. A.; SHEIKH, F. N.; JAMAL, S.; EZEH, J. K.; AKHTAR, A. Coronavirus (COVID-19): A Review of Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. **Cureus**, 21 mar. 2020. DOI 10.7759/cureus.7355.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572–584, out. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5).

HIJIKATA, A.; SHIONYU-MITSUYAMA, C.; NAKAE, S.; SHIONYU, M.; OTA, M.; KANAYA, S.; SHIRAI, T. Knowledge-based structural models of SARS-CoV-2 proteins and their complexes with potential drugs. **FEBS Letters**, v. 594, n. 12, p. 1960–1973, jun. 2020. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13806>.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N.-H.; NITSCHKE, A.;

MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
<https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020>.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

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. 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**, v. 91, p. 264–266, fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.009>.

IBARRA, C.; NIESLANIK, B. S.; ATKINS, W. M. Contribution of Aromatic–Aromatic Interactions to the Anomalous p K_a of Tyrosine-9 and the C-Terminal Dynamics of Glutathione S -Transferase A1-1 †. **Biochemistry**, v. 40, n. 35, p. 10614–10624, set. 2001. <https://doi.org/10.1021/bi010672h>.

IMANISHI, N.; TUJI, Y.; KATADA, Y.; MARUHASHI, M.; KONOSU, S.; MANTANI, N.; TERASAWA, K.; OCHIAI, H. Additional Inhibitory Effect of Tea Extract on the Growth of Influenza A and B Viruses in MDCK Cells. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 7, p. 491–494, jul. 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02724.x>.

IMBERTY, A.; HARDMAN, K. D.; CARVER, J. P.; PEREZ, S. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.6.631>.

IRANSHAHI, M.; REZAEI, R.; PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. **Life Sciences**, v. 137, p. 125–132, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.07.014>.

IWASHINA, T. Flavonoid Properties in Plant Families Synthesizing Betalain Pigments (Review). **Natural Product Communications**, v. 10, n. 6, p. 1934578X1501000, jun. 2015. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000675>.

JIANG, F.; DENG, L.; ZHANG, L.; CAI, Y.; CHEUNG, C. W.; XIA, Z. Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Journal of General Internal Medicine**, v. 35, n. 5, p. 1545–1549, maio 2020. <https://doi.org/10.1007/s11606-020-05762-w>.

JIANG, S.; DU, L.; SHI, Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 275–277, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1723441>.

JIN, Z.; DU, X.; XU, Y.; DENG, Y.; LIU, M.; ZHAO, Y.; ZHANG, B.; LI, X.; ZHANG, L.; PENG, C.; DUAN, Y.; YU, J.; WANG, L.; YANG, K.; LIU, F.; JIANG, R.; YANG, X.; YOU,

T.; LIU, X.; ... YANG, H. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289–293, jun. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.

KARKI, R.; SHARMA, B. R.; TULADHAR, S.; WILLIAMS, E. P.; ZALDUONDO, L.; SAMIR, P.; ZHENG, M.; SUNDARAM, B.; BANOTH, B.; MALIREDDI, R. K. S.; SCHREINER, P.; NEALE, G.; VOGEL, P.; WEBBY, R.; JONSSON, C. B.; KANNEGANTI, T.-D. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 149–168.e17, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.025>.

KAUR, N.; KAUR, A.; BANSAL, Y.; SHAH, D. I.; BANSAL, G.; SINGH, M. Design, synthesis, and evaluation of 5-sulfamoyl benzimidazole derivatives as novel angiotensin II receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 24, p. 10210–10215, 15 dez. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.10.056>.

KAWASE, M.; SHIRATO, K.; VAN DER HOEK, L.; TAGUCHI, F.; MATSUYAMA, S. Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 6537–6545, 15 jun. 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.00094-12>.

KHAERUNNISA, S.; KURNIAWAN, H.; AWALUDDIN, R.; SUHARTATI, S.; SOETJIPTO, S. Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (Mpro) From Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study. preprint. [S. 1.]: **MEDICINE & PHARMACOLOGY**, 13 mar. 2020. DOI 10.20944/preprints202003.0226.v1.

KHELFAOUI, H.; HARKATI, D.; SALEH, B. A. Molecular docking, molecular dynamics simulations and reactivity, studies on approved drugs library targeting ACE2 and SARS-CoV-2 binding with ACE2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–17, 5 ago. 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1803967>.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229–245, 2004. <https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ04003X>.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>.

KNIPPING, K.; GARSSSEN, J.; VAN'T LAND, B. An evaluation of the inhibitory effects against rotavirus infection of edible plant extracts. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 137, dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-137>.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. 29 dez. 2013. **The Scientific World Journal**. [Review Article]. DOI <https://doi.org/10.1155/2013/162750>. Disponível em: https://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/?wptouch_preview_theme=enabled.epub. Acesso em: 18 mar. 2021.

KURODA, Y.; YAMAGATA, H.; NEMOTO, M.; INAGAKI, K.; TAMURA, T.; MAEDA, K.

Antiviral effect of sinefungin on in vitro growth of feline herpesvirus type 1. **The Journal of Antibiotics**, v. 72, n. 12, p. 981–985, dez. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0234-4>.

LAN, J.; GE, J.; YU, J.; SHAN, S.; ZHOU, H.; FAN, S.; ZHANG, Q.; SHI, X.; WANG, Q.; ZHANG, L.; WANG, X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, v. 581, n. 7807, p. 215–220, maio 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.

LEUNG, D.; ABBENANTE, G.; FAIRLIE, D. P. Protease Inhibitors: Current Status and Future Prospects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 305–341, fev. 2000. <https://doi.org/10.1021/jm990412m>.

LI, Y.; XIE, Z.; LIN, W.; CAI, W.; WEN, C.; GUAN, Y.; MO, X.; WANG, J.; WANG, Y.; PENG, P.; CHEN, X.; HONG, W.; XIAO, G.; LIU, J.; ZHANG, L.; HU, F.; LI, F.; ZHANG, F.; DENG, X.; LI, L. Efficacy and Safety of Lopinavir/Ritonavir or Arbidol in Adult Patients with Mild/Moderate COVID-19: An Exploratory Randomized Controlled Trial. **Med**, v. 1, n. 1, p. 105–113.e4, dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.04.001>.

LIU, F.; KOVALEVSKY, A. Y.; TIE, Y.; GHOSH, A. K.; HARRISON, R. W.; WEBER, I. T. Effect of Flap Mutations on Structure of HIV-1 Protease and Inhibition by Saquinavir and Darunavir. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, n. 1, p. 102–115, ago. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.062>.

LIU, Z.; ZHAO, J.; LI, W.; SHEN, L.; HUANG, S.; TANG, J.; DUAN, J.; FANG, F.; HUANG, Y.; CHANG, H.; CHEN, Z.; ZHANG, R. Computational screen and experimental validation of anti-influenza effects of quercetin and chlorogenic acid from traditional Chinese medicine. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19095, maio 2016. <https://doi.org/10.1038/srep19095>.

LIU, Z.; ZHAO, J.; LI, W.; WANG, X.; XU, J.; XIE, J.; TAO, K.; SHEN, L.; ZHANG, R. Molecular Docking of Potential Inhibitors for Influenza H7N9. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2015, p. 1–8, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/480764>.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; NIU, P.; YANG, B.; WU, H.; WANG, W.; SONG, H.; HUANG, B.; ZHU, N.; BI, Y.; MA, X.; ZHAN, F.; WANG, L.; HU, T.; ZHOU, H.; HU, Z.; ZHOU, W.; ZHAO, L.; ... TAN, W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, fev. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).

LYU, S.-Y.; RHIM, J.-Y.; PARK, W.-B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 11, p. 1293–1301, nov. 2005. <https://doi.org/10.1007/BF02978215>.

MACHADO, C.; NICOLINI, K.; NICOLINI, J. ESTUDOS DE QSAR PARA SARS-CoV-2. **Química Nova**, 2020. DOI 10.21577/0100-4042.20170600. Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9153&nomeArquivo=AR2020-0241.pdf. Acesso em: 8 mar. 2021.

- MAHMOUD, A. M.; HERNÁNDEZ BAUTISTA, R. J.; SANDHU, M. A.; HUSSEIN, O. E. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–19, 10 mar. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5484138>.
- MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 1 maio 2004. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- MATTHIES, A.; CLAVEL, T.; GÜTSCHOW, M.; ENGST, W.; HALLER, D.; BLAUT, M.; BRAUNE, A. Conversion of Daidzein and Genistein by an Anaerobic Bacterium Newly Isolated from the Mouse Intestine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4847–4852, 1 ago. 2008. <https://doi.org/10.1128/AEM.00555-08>.
- MAURYA, V. K.; KUMAR, S.; PRASAD, A. K.; BHATT, M. L. B.; SAXENA, S. K. Structure-based drug designing for potential antiviral activity of selected natural products from Ayurveda against SARS-CoV-2 spike glycoprotein and its cellular receptor. **VirusDisease**, v. 31, n. 2, p. 179–193, jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13337-020-00598-8>.
- MCDONOUGH, M. A.; ANDERSON, J. W.; SILVAGGI, N. R.; PRATT, R. F.; KNOX, J. R.; KELLY, J. A. Structures of Two Kinetic Intermediates Reveal Species Specificity of Penicillin-binding Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, n. 1, p. 111–122, set. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00742-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00742-8).
- MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; BUCK, A.; CURTIS, J. D.; DIBBLE, J. P.; HUSTON, G.; TIGHE, M.; HAMADA, H.; SELL, S.; DUTTON, R. W.; SWAIN, S. L. IL-10 Deficiency Unleashes an Influenza-Specific Th17 Response and Enhances Survival against High-Dose Challenge. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 12, p. 7353–7363, 15 jun. 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900657>.
- MEHLA, R.; BIVALKAR-MEHLA, S.; CHAUHAN, A. A Flavonoid, Luteolin, Cripples HIV-1 by Abrogation of Tat Function. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27915, 30 nov. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027915>.
- MENACHERY, V. D.; DEBBINK, K.; BARIC, R. S. Coronavirus non-structural protein 16: Evasion, attenuation, and possible treatments. **Virus Research**, v. 194, p. 191–199, dez. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.09.009>.
- MISHRA, A.; KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Scientific Validation of the Medicinal Efficacy of *Tinospora cordifolia*. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–8, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/292934>.
- MORALES, P.; CURTIS, N.; ZÁRATE, S.; BASTIDA, A.; BOLANOS-GARCIA, V. Interfering with mRNA Methylation by the 2'O-Methyltransferase (NSP16) from SARS-CoV-2 to Tackle the COVID-19 Disease. **Catalysts**, v. 10, n. 9, p. 1023, 5 set. 2020.

<https://doi.org/10.3390/catal10091023>.

MURALI, K. S.; SIVASUBRAMANIAN, S.; VINCENT, S.; MURUGAN, S. B.; GIRIDARAN, B.; DINESH, S.; GUNASEKARAN, P.; KRISHNASAMY, K.; SATHISHKUMAR, R. Anti—chikungunya activity of luteolin and apigenin rich fraction from *Cynodon dactylon*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 8, n. 5, p. 352–358, maio 2015. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60343-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60343-6).

NGWA, W.; KUMAR, R.; THOMPSON, D.; LYERLY, W.; MOORE, R.; REID, T.-E.; LOWE, H.; TOYANG, N. Potential of Flavonoid-Inspired Phytomedicines against COVID-19. *Molecules*, v. 25, n. 11, p. 2707, 11 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25112707>.

NI, L.; YE, F.; CHENG, M.-L.; FENG, Y.; DENG, Y.-Q.; ZHAO, H.; WEI, P.; GE, J.; GOU, M.; LI, X.; SUN, L.; CAO, T.; WANG, P.; ZHOU, C.; ZHANG, R.; LIANG, P.; GUO, H.; WANG, X.; QIN, C.-F.; ... DONG, C. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*, v. 52, n. 6, p. 971–977.e3, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>.

NINFALI, P.; ANTONELLI, A.; MAGNANI, M.; SCARPA, E. S. Antiviral Properties of Flavonoids and Delivery Strategies. *Nutrients*, v. 12, n. 9, p. 2534, set. 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12092534>.

NISHIO, M.; UMEZAWA, Y.; FANTINI, J.; WEISS, M. S.; CHAKRABARTI, P. CH– π hydrogen bonds in biological macromolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 16, n. 25, p. 12648–12683, 2014. <https://doi.org/10.1039/C4CP00099D>

ORTEGA, J. T.; SUÁREZ, A. I.; SERRANO, M. L.; BAPTISTA, J.; PUJOL, F. H.; RANGEL, H. R. The role of the glycosyl moiety of myricetin derivatives in anti-HIV-1 activity in vitro. *AIDS Research and Therapy*, v. 14, n. 1, p. 57, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0183-6>.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, v. 5, p. e47, 2016. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.

PANDEY, P.; RANE, J. S.; CHATTERJEE, A.; KUMAR, A.; KHAN, R.; PRAKASH, A.; RAY, S. Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: an in silico study for drug development. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, p. 1–11, 22 jul. 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796811>.

PAPPENBERGER, G.; SCHULZ-GASCH, T.; KUSZNIR, E.; MÜLLER, F.; HENNIG, M. Structure-assisted discovery of an aminothiazole derivative as a lead molecule for inhibition of bacterial fatty-acid synthesis. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, v. 63, n. 12, p. 1208–1216, 1 dez. 2007. <https://doi.org/10.1107/S0907444907049852>.

PAREDES, A.; ALZURU, M.; MENDEZ, J.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. Anti-Sindbis Activity of Flavanones Hesperetin and Naringenin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 26, n. 1, p. 108–109, 2003. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.108>.

PETERSON, L. COVID-19 and Flavonoids: In Silico Molecular Dynamics Docking to the Active Catalytic Site of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Main Protease. **SSRN Scholarly Paper**, n. ID 3599426. Rochester, NY: Social Science Research Network, 12 maio 2020. Disponível em: <https://papers.ssrn.com/abstract=3599426>. Acesso em: 14 mar. 2021.

Q. ALMEIDA-NETO, F. W.; CASTRO MATOS, M. G.; MARINHO, E. M.; MARINHO, M. M.; RÓSEO PAULA PESSOA BEZERRA DE MENEZES, R.; SAMPAIO, T. L.; BANDEIRA, P. N.; CELEDONIO FERNANDES, C. F.; MAGNO RODRIGUES TEIXEIRA, A.; MARINHO, E. S.; DE LIMA-NETO, P.; SILVA DOS SANTOS, H. In silico study of the potential interactions of 4'-acetamidedalcones with protein targets in SARS-CoV-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 537, p. 71–77, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.12.074>.

QIU, T.; LIANG, S.; DABBOUS, M.; WANG, Y.; HAN, R.; TOUMI, M. Chinese guidelines related to novel coronavirus pneumonia. **Journal of Market Access & Health Policy**, v. 8, n. 1, p. 1818446, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/20016689.2020.1818446>.

RAWEL, H. M.; ROHN, S.; KROLL, J. Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, n. 3–5, p. 109–120, set. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00044-8).

REN, R.; YIN, S.; LAI, B.; MA, L.; WEN, J.; ZHANG, X.; LAI, F.; LIU, S.; LI, L. Myricetin antagonizes semen-derived enhancer of viral infection (SEVI) formation and influences its infection-enhancing activity. **Retrovirology**, v. 15, n. 1, p. 49, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0432-3>.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; ALMEIDA, J. R. de; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. da. Virtual Screening Strategies in Drug Design. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, 2012. DOI 10.5935/1984-835.20120055. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20120055>. Acesso em: 10 abr. 2021.

ROSAS-LEMUS, M.; MINASOV, G.; SHUVALOVA, L.; INNISS, N. L.; KIRYUKHINA, O.; BRUNZELLE, J.; SATCHELL, K. J. F. High-resolution structures of the SARS-CoV-2 2'-O-methyltransferase reveal strategies for structure-based inhibitor design. **Science Signaling**, v. 13, n. 651, 29 set. 2020. DOI 10.1126/scisignal.abe1202.

ROSENBERG, E. S.; DUFORT, E. M.; UDO, T.; WILBERSCHIED, L. A.; KUMAR, J.; TESORIERO, J.; WEINBERG, P.; KIRKWOOD, J.; MUSE, A.; DEHOVITZ, J.; BLOG, D. S.; HUTTON, B.; HOLTGRAVE, D. R.; ZUCKER, H. A. Association of Treatment With Hydroxychloroquine or Azithromycin With In-Hospital Mortality in Patients With COVID-19 in New York State. **JAMA**, v. 323, n. 24, p. 2493, 23 jun. 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8630>.

RUSSO, M.; MOCCIA, S.; SPAGNUOLO, C.; TEDESCO, I.; RUSSO, G. L. Roles of flavonoids against coronavirus infection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 328, p. 109211, set. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109211>.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; ADAMCZYK, R.; BARTOSZ, G. Protection against peroxynitrite reactions by flavonoids. **Food Chemistry**, v. 164, p. 228–233, dez. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.105>.

SALIM, P. H.; XAVIER, R. M. Influência dos polimorfismos genéticos (IL10/CXCL8/CXCR2/ NFκB) na susceptibilidade das doenças reumatológicas autoimunes, **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 4, p. 301–310, 2014.

SALONEN, L. M.; HOLLAND, M. C.; KAIB, P. S. J.; HAAP, W.; BENZ, J.; MARY, J.-L.; KUSTER, O.; SCHWEIZER, W. B.; BANNER, D. W.; DIEDERICH, F. Molecular Recognition at the Active Site of Factor Xa: Cation- π Interactions, Stacking on Planar Peptide Surfaces, and Replacement of Structural Water. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 1, p. 213–222, 2 jan. 2012. <https://doi.org/10.1002/chem.201102571>.

SARIAN, M. N.; AHMED, Q. U.; MAT SO'AD, S. Z.; ALHASSAN, A. M.; MURUGESU, S.; PERUMAL, V.; SYED MOHAMAD, S. N. A.; KHATIB, A.; LATIP, J. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–14, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8386065>.

SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P., Estratégias de Triagem SHARMA, A.; GOYAL, S.; YADAV, A. K.; KUMAR, P.; GUPTA, L. In-silico screening of plant-derived antivirals against main protease, 3CL pro and endoribonuclease, NSP15 proteins of SARS-CoV-2. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–15, 8 set. 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1808077>.

SHEN, C.; WANG, Z.; ZHAO, F.; YANG, Y.; LI, J.; YUAN, J.; WANG, F.; LI, D.; YANG, M.; XING, L.; WEI, J.; XIAO, H.; YANG, Y.; QU, J.; QING, L.; CHEN, L.; XU, Z.; PENG, L.; LI, Y.; ... LIU, L. Treatment of 5 Critically Ill Patients With COVID-19 With Convalescent Plasma. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1582, 28 abr. 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4783>.

SINGH, S.; SK, M. F.; SONAWANE, A.; KAR, P.; SADHUKHAN, S. Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an in-silico analysis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–16, 28 jul. 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1796810>.

SOY, M.; KESER, G.; ATAGÜNDÜZ, P.; TABAK, F.; ATAGÜNDÜZ, I.; KAYHAN, S. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 7, p. 2085–2094, jul. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5>.

TAHIR UL QAMAR, M.; ALQAHTANI, S. M.; ALAMRI, M. A.; CHEN, L.-L. Structural basis of SARS-CoV-2 3CLpro and anti-COVID-19 drug discovery from medicinal plants. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 313–319, ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.009>.

TALLEI, T. E.; TUMILAAR, S. G.; NIODE, N. J.; FATIMAWALI; KEPEL, B. J.; IDROES, R.; EFFENDI, Y.; SAKIB, S. A.; EMRAN, T. B. Potential of Plant Bioactive Compounds as SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) and Spike (S) Glycoprotein Inhibitors: A Molecular Docking Study. **Scientifica**, v. 2020, p. 1–18, 23 dez. 2020.

<https://doi.org/10.1155/2020/6307457>.

TAZIKEH-LEMESKI, E.; MORADI, S.; RAOUFI, R.; SHAHLAEI, M.; JANLOU, M. A. M.; ZOLGHADRI, S. Targeting SARS-CoV-2 non-structural protein 16: a virtual drug repurposing study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1–14, 23 jun. 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1779133>

THEOHARIDES, T. C.; ALEXANDRAKIS, M.; KEMPURAJ, D.; LY TINAS, M. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 14, n. 3, p. 119–127, dez. 2001.

TO, K. K.-W.; TSANG, O. T.-Y.; LEUNG, W.-S.; TAM, A. R.; WU, T.-C.; LUNG, D. C.; YIP, C. C.-Y.; CAI, J.-P.; CHAN, J. M.-C.; CHIK, T. S.-H.; LAU, D. P.-L.; CHOI, C. Y.-C.; CHEN, L.-L.; CHAN, W.-M.; CHAN, K.-H.; IP, J. D.; NG, A. C.-K.; POON, R. W.-S.; LUO, C.-T.; ... YUEN, K.-Y. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 565–574, maio 2020. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1).

TOOR, S. M.; SALEH, R.; SASIDHARAN NAIR, V.; TAHA, R. Z.; ELKORD, E. T-cell responses and therapies against SARS-CoV-2 infection. **Immunology**, v. 162, n. 1, p. 30–43, jan. 2021. <https://doi.org/10.1111/imm.13262>.

TROUILLAS, P.; MARSAL, P.; SIRI, D.; LAZZARONI, R.; DUROUX, J.-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 679–688, ago. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.042>.

TSAI, T.; KROEHL, M. E.; SMITH, S. M.; THOMPSON, A. M.; DAI, I. Y.; TRINKLEY, K. E. Efficacy and safety of twice- vs once-daily dosing of lisinopril for hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 19, n. 9, p. 868–873, set. 2017. <https://doi.org/10.1111/jch.13011>.

UTOMO, R. Y.; IKAWATI, M.; MEIYANTO, E. Revealing the Potency of Citrus and Galangal Constituents to Halt SARS-CoV-2 Infection. preprint. [S. l.]: **MEDICINE & PHARMACOLOGY**, 12 mar. 2020. DOI 10.20944/preprints202003.0214.v1

V'KOVSKI, P.; KRATZEL, A.; STEINER, S.; STALDER, H.; THIEL, V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p.739-

VITHANI, N.; WARD, M. D.; ZIMMERMAN, M. I.; NOVAK, B.; BOROWSKY, J. H.; SINGH, S.; BOWMAN, G. R. SARS-CoV-2 Nsp16 activation mechanism and a cryptic pocket with pan-coronavirus antiviral potential. preprint. [S. l.]: **Biophysics**, 10 dez. 2020. DOI 10.1101/2020.12.10.420109.

WAN, S.; YI, Q.; FAN, S.; LV, J.; ZHANG, X.; GUO, L.; LANG, C.; XIAO, Q.; XIAO, K.; YI, Z.; QIANG, M.; XIANG, J.; ZHANG, B.; CHEN, Y. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel

coronavirus pneumonia (NCP). preprint. [S. l.]: **Hematology**, 12 fev. 2020. DOI 10.1101/2020.02.10.20021832.

WANG, L.; WANG, J.; WANG, L.; MA, S.; LIU, Y. Anti-Enterovirus 71 Agents of Natural Products. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 16320–16333, 9 set. 2015.
<https://doi.org/10.3390/molecules200916320>.

WANG, M.; CAO, R.; ZHANG, L.; YANG, X.; LIU, J.; XU, M.; SHI, Z.; HU, Z.; ZHONG, W.; XIAO, G. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, v. 30, n. 3, p. 269 – 271, mar. 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>.

WANG, R.; ZHANG, X.; IRWIN, D. M.; SHEN, Y. Emergence of SARS-like coronavirus poses new challenge in China. **Journal of Infection**, v. 80, n. 3, p. 350–371, mar. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.01.017>.

WANG, Y.; WANG, Y.; CHEN, Y.; QIN, Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 568–576, jun. 2020.
<https://doi.org/10.1002/jmv.25748>.

WANG, Z.-F.; LIU, J.; YANG, Y.-A.; ZHU, H.-L. A Review: The Anti-inflammatory, Anticancer and Antibacterial Properties of Four Kinds of Licorice Flavonoids Isolated from Licorice. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 12, p. 1997–2011, 23 abr. 2020.
<https://doi.org/10.2174/0929867325666181001104550>.

WILLIAMSON, G.; CLIFFORD, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. S3, p. S48–S66, out. 2010. <https://doi.org/10.1017/S0007114510003946>.

World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report-51. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10 . Acessado em 16 de março de 2020.

WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y.-M.; WANG, W.; SONG, Z.-G.; HU, Y.; TAO, Z.-W.; TIAN, J.-H.; PEI, Y.-Y.; YUAN, M.-L.; ZHANG, Y.-L.; DAI, F.-H.; LIU, Y.; WANG, Q.-M.; ZHENG, J.-J.; XU, L.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y.-Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.

WU, W.; LI, R.; LI, X.; HE, J.; JIANG, S.; LIU, S.; YANG, J. Quercetin as an Antiviral Agent Inhibits Influenza A Virus (IAV) Entry. **Viruses**, v. 8, n. 1, p. 6, 25 dez. 2015.
<https://doi.org/10.3390/v8010006>.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. **JAMA**, v. 323, n. 13, p. 1239, 7 abr. 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>.

XU, H.; ZHONG, L.; DENG, J.; PENG, J.; DAN, H.; ZENG, X.; LI, T.; CHEN, Q. High

expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa.

International Journal of Oral Science, v. 12, n. 1, p. 8, dez. 2020.

<https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>.

XU, L.; SU, W.; JIN, J.; CHEN, J.; LI, X.; ZHANG, X.; SUN, M.; SUN, S.; FAN, P.; AN, D.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; KONG, W.; MA, T.; JIANG, C. Identification of Luteolin as Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16 Inhibitors through Reporter Viruses and Cell Viability-Based Screening. **Viruses**, v. 6, n. 7, p. 2778–2795, 17 jul. 2014.

<https://doi.org/10.3390/v6072778>.

XU, X.; HAN, M.; LI, T.; SUN, W.; WANG, D.; FU, B.; ZHOU, Y.; ZHENG, X.; YANG, Y.; LI, X.; ZHANG, X.; PAN, A.; WEI, H. Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 20, p. 10970–10975, 19 maio 2020. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>.

YANG, H.; XIE, W.; XUE, X.; YANG, K.; MA, J.; LIANG, W.; ZHAO, Q.; ZHOU, Z.; PEI, D.; ZIEBUHR, J.; HILGENFELD, R.; YUEN, K. Y.; WONG, L.; GAO, G.; CHEN, S.; CHEN, Z.; MA, D.; BARTLAM, M.; RAO, Z. Design of Wide-Spectrum Inhibitors Targeting Coronavirus Main Proteases. **PLoS Biology**, v. 3, n. 10, p. e324, 6 set. 2005.

<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030324>.

YAO, X.; YE, F.; ZHANG, M.; CUI, C.; HUANG, B.; NIU, P.; LIU, X.; ZHAO, L.; DONG, E.; SONG, C.; ZHAN, S.; LU, R.; LI, H.; TAN, W.; LIU, D. In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 732 – 739, 28 jul. 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa237>.

YU, M.-S.; LEE, J.; LEE, J. M.; KIM, Y.; CHIN, Y.-W.; JEE, J.-G.; KEUM, Y.-S.; JEONG, Y.-J. Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 12, p. 4049–4054, jun. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.081>.

YU, R.; CHEN, L.; LAN, R.; SHEN, R.; LI, P. Computational screening of antagonists against the SARS-CoV-2 (COVID-19) coronavirus by molecular docking. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 2, p. 106012, ago. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106012>.

ZAKARYAN, H.; ARABYAN, E.; OO, A.; ZANDI, K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of Virology**, v. 162, n. 9, p. 2539–2551, set. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3417-y>.

ZAKI, A. A.; AL-KARMALAWY, A. A.; EL-AMIER, Y. A.; ASHOUR, A. Molecular docking reveals the potential of Cleome amblyocarpa isolated compounds to inhibit COVID-19 virus main protease. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 39, p. 16752–16758, 2020.

<https://doi.org/10.1039/D0NJ03611K>

ZHANG, J.; ZHENG, Y. G. SAM/SAH Analogs as Versatile Tools for SAM-Dependent Methyltransferases. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 3, p. 583–597, 18 mar. 2016.

<https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00812>.

ZHANG, Y.-Z.; HOLMES, E. C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 223–227, abr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035>.

ZHONG, J.; TANG, J.; YE, C.; DONG, L. The immunology of COVID-19: is immune modulation an option for treatment? **The Lancet Rheumatology**, v. 2, n. 7, p. e428–e436, jul. 2020. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30120-X](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30120-X).

ZHONG, W.; GALLIVAN, J. P.; ZHANG, Y.; LI, L.; LESTER, H. A.; DOUGHERTY, D. A. From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: A cation-binding site in the nicotinic receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12088–12093, 13 out. 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12088>.

ZHOU, F.; YU, T.; DU, R.; FAN, G.; LIU, Y.; LIU, Z.; XIANG, J.; WANG, Y.; SONG, B.; GU, X.; GUAN, L.; WEI, Y.; LI, H.; WU, X.; XU, J.; TU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, H.; CAO, B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, mar. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).

ZHOU, P.; YANG, X.-L.; WANG, X.-G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.-R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.-L.; CHEN, H.-D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R.-D.; LIU, M.-Q.; CHEN, Y.; SHEN, X.-R.; WANG, X.; ... SHI, Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; ZHAO, X.; HUANG, B.; SHI, W.; LU, R.; NIU, P.; ZHAN, F.; MA, X.; WANG, D.; XU, W.; WU, G.; GAO, G. F.; TAN, W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

ZHU, Z.; LU, Z.; XU, T.; CHEN, C.; YANG, G.; ZHA, T.; LU, J.; XUE, Y. Arbidol monotherapy is superior to lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e21–e23, jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.060>.