



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS**  
**NATURAIS**

**CAMILA SILLOS ROSAS BRISIGHELLO**

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DE COMPOSTOS FENÓLICOS**  
**COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DO SARS-CoV-2**

**FORTALEZA**

**2024**

CAMILA SILLOS ROSAS BRISIGHELLO

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DO SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Aplicação biotecnológica de moléculas biologicamente ativas.

Orientador: Prof. Dr. Cléberon de Freitas Fernandes.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carla Freire Celedonio Fernandes.

FORTALEZA

2024

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

---

B86a Brisighello, Camila Sillos Rosas.  
Análise da atividade antiviral in vitro de compostos fenólicos como potencial alternativa para o controle do SARS-Cov-2 / Camila Sillos Rosas Brisighello. – 2024.  
87 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Cléber de Freitas Fernandes.

Coorientação: Prof. Dr. Carla Freire Celedonio Fernandes .

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Ácido elágico. 4. Produtos naturais. I. Título.

CDD 660.6

---

CAMILA SILLOS ROSAS BRISIGHELLO

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DE COMPOSTOS FENÓLICOS  
COMO POTENCIAL ALTERNATIVA PARA O CONTROLE DO SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Aplicação biotecnológica de moléculas biologicamente ativas.

Aprovada em: 29/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Cléber de Freitas Fernandes (Orientador)  
Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Soraya dos Santos Pereira  
Fundação Oswaldo Cruz- Rondônia (Fiocruz)

---

Prof. Dr. Daniel Pascoalino Pinheiro  
Fundação Oswaldo Cruz- Ceará (Fiocruz)

Dedico este trabalho à minha querida avó  
- Rita Sillos Rosas (*in memoriam*), que me  
compartilhou virtude, amor e carinho desde  
minha infância.

## AGRADECIMENTOS

À **CAPES**, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **Funcap**, Processo: FIO-0167-00060.02.00/20 (CFCF), Edital Inova Fiocruz Funcap, pelo apoio financeiro.

À **Fiocruz Ceará**, por disponibilizar toda a estrutura necessária para realização do projeto, e a todos os seus integrantes, dentre os técnicos, estagiários, pesquisadores e pessoas envolvidas nos setores administrativos da instituição.

À **Embrapa Agroindústria Tropical** e à **Rede Genômica Fiocruz**, por disponibilizar os materiais necessários aos experimentos e ao apoio técnico.

À **Secretaria da Saúde do Estado do Ceará**, pela disponibilidade do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará para desenvolver esse estudo e a todos os seus integrantes que contribuíram para essa parceria.

À minha família, em especial aos meus pais **Tania Maria Sillos Rosas Brisighello** e **Ayrton Luiz Shimizu Brisighello** que tiveram paciência e souberam me motivar durante toda a vida. E à minha irmã **Luana Sillos Rosas Brisighello** pelo carinho.

Ao meu namorado, **Arthur Vieira Santos**, que me apoiou e me motivou com inúmeras conversas que fizeram a diferença principalmente nestes últimos meses, além de trazer para minha vida sua família que me apoiou como se eu fizesse parte. E à **Tequila**, minha companhia mais genuína de todos os momentos.

Ao Prof. Dr. **Cléber de Freitas Fernandes** e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Carla Freire Celedonio Fernandes** pelas excelentes orientações, sempre estando dispostos a ajudar com muita dedicação e simpatia; foi de uma importância indescritível para o meu desenvolvimento durante estes últimos dois anos.

Aos Professores Dr.<sup>a</sup> **Natália Florêncio Martins** e Prof. Dr. **Maurício van Tilburg** pela colaboração indispensável no estudo, estando muito pacientes e prontamente disponíveis desde o início dos experimentos.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof.<sup>ta</sup> Dr.<sup>a</sup> **Soraya dos Santos Pereira** e Prof. Dr. **Daniel Pascoalino Pinheiro** pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Mestre **Vânia Carla de Sousa** pelo companheirismo, incentivo, apoio e todos momentos que decorreram na construção esse projeto.

Às Mestres **Angela Malaquias, Anna Carolina, Brunheld Maia, Livia Coelho e Vivian dos Santos**; e a **Maria Eduarda** pelas reflexões, sugestões recebidas e todo o companheirismo.

Aos colegas do Grupo de **Plataforma de anticorpos** pelos ensinamentos e todo apoio prestado, sobretudo, à **Larissa Pontes**, o trabalho não seria o mesmo sem suas sugestões.

Às minhas amigas de colégio, **Larissa Andrea, Eduardda Campos e Sabrina Karen**, pela amizade, atenção e carinho quando mais precisei.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pelo companheirismo e descontração ao decorrer das disciplinas realizadas.

Aos meus colegas de turma da graduação, em especial **Caio Correia, Daniel Rubens, Breno Kelvin, Gabrieli Sobral, Letícia Rodrigues, Livia Pontes, Maria Eduarda, Matheus Finger, Pedro Victor e Saulo Cassiano**, que compartilharam horas de estudo e de convivência.

Por fim, muito obrigada a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse estudo pudesse ser desenvolvido e concretizado.

“O medo é opção, coragem é respeito. Tentar é obrigação.” (Diego José Ferrero, 2015)



## RESUMO

A emergência sanitária gerada pela pandemia COVID-19 nos últimos anos instigou a busca por estratégias científicas para a mitigação de danos provocados pelo vírus ao ser humano. Mesmo com medicamentos aprovados pela FDA ainda há restrição de uso em pacientes e alguns estão disponíveis apenas para uso hospitalar. Além disso, o custo mais elevado desses medicamentos pode representar um desafio para a ampla acessibilidade. A biodiversidade brasileira é uma fonte promissora para a prospecção de moléculas com potencial terapêutico. Diante disso, abre-se um horizonte de oportunidades para a descoberta e desenvolvimento de novas estratégias no controle do SARS-CoV-2. Este trabalho visou investigar a atividade antiviral de compostos fenólicos da biodiversidade brasileira e a interação destes com alvos proteicos específicos do SARS-CoV-2. Assim, moléculas obtidas a partir de compostos presentes na extratoteca da Embrapa Agroindústria Tropical (Tropical DB) foram avaliadas quanto à viabilidade celular e atividade antiviral. Na primeira triagem foram empregadas células Vero pelo método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As concentrações obtidas que mantiveram a viabilidade acima de 70% em teste MTT foram utilizadas nos ensaios de neutralização viral (PRNT). A partir dos resultados de PRNT, foram realizados ensaios *in silico* de ancoragem molecular para as moléculas selecionadas contra três alvos: proteína *Spike*, protease M<sup>pro</sup> e RNA-Polimerase RNA-Dependente (RdRp). Os três compostos selecionados na triagem foram: ácido clorogênico, ácido elágico e timol, sendo as concentrações que reduzem a viabilidade e estado metabólico celular em até 30% de: 100 µg/mL; 3,125 µg/mL e 25 µg/mL, respectivamente. Os resultados do teste PRNT, quando as moléculas em contato diretamente com o vírus, mostraram percentual de formação de placas virais de 96,7%, 30,9% e 89,1% para o ácido clorogênico, ácido elágico e timol, respectivamente. O ácido elágico se destacou pela inibição viral de 69,1%. Nenhum dos compostos fenólicos analisados apresentaram atividade viral quando foram analisados se atuavam isoladamente nas células. A IC<sub>50</sub> do ácido elágico foi 0,3492 µg/mL. Na ancoragem molecular, o ácido clorogênico obteve melhor desempenho de energia quando avaliado para a proteína S, o ácido elágico obteve maior valor de pontuação para RdRp e o timol obteve triplo modo de ação. Destaca-se o potencial, especialmente do ácido elágico, como uma possível molécula candidata para estudos futuros que visem desenvolver alternativas de tratamento para a COVID-19. Esta molécula pode ser utilizada na suplementação humana beneficiando indivíduos com alto risco de complicações graves de COVID-19 e beneficiando países com restrições financeiras e de infraestrutura de saúde. Essas descobertas enfatizam a importância de pesquisas que buscam estabelecer novas

alternativas na descoberta de agentes antivirais, contribuindo para a compreensão da importância da evolução dos produtos derivados de compostos naturais.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; COVID-19; ácido elágico; produtos naturais.

## ABSTRACT

The health emergency generated by the COVID-19 pandemic in recent years has instigated the search for scientific strategies to mitigate the damage caused by the virus to humans. Even with FDA-approved drugs, there are still restrictions on their use in patients and some are only available for hospital use. In addition, the higher cost of these drugs can pose a challenge to widespread accessibility. Brazilian biodiversity is a promising source for prospecting molecules with therapeutic potential. This opens up a horizon of opportunities for the discovery and development of new strategies for controlling SARS-CoV-2. This work aimed to investigate the antiviral activity of phenolic compounds from Brazilian biodiversity and their interaction with specific protein targets of SARS-CoV-2. Thus, molecules obtained from compounds present in the extract library of Embrapa Agroindústria Tropical (Tropical DB) were evaluated for cell viability and antiviral activity. In the first screening, Vero cells were used using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction method. The concentrations obtained which maintained viability above 70% in the MTT test were used in the viral neutralization tests (PRNT). Based on the PRNT results, *in silico* molecular docking tests were carried out for the selected molecules against three targets: Spike protein, Mpro protease and RNA-Dependent RNA-Polymerase (RdRp). The three compounds selected in the screening were: chlorogenic acid, ellagic acid and thymol, with concentrations that reduce cell viability and metabolic status by up to 30% of: 100 µg/mL; 3.125 µg/mL and 25 µg/mL, respectively. The results of the PRNT test, when the molecules were directly in contact with the virus, showed a percentage of viral plaque formation of 96.7%, 30.9% and 89.1% for chlorogenic acid, ellagic acid and thymol, respectively. Ellagic acid stood out for its 69.1% viral inhibition. None of the phenolic compounds analyzed showed viral activity when they were analyzed if they acted alone on the cells. The IC<sub>50</sub> of ellagic acid was 0.3492 µg/mL. In molecular docking, chlorogenic acid had the best energy performance when evaluated for protein S, ellagic acid had the highest score for RdRp and thymol had a triple mode of action. This highlights the potential, especially of ellagic acid, as a possible candidate molecule for future studies aimed at developing treatment alternatives for COVID-19. This molecule can be used in human supplementation, benefiting individuals at high risk of serious complications from COVID-19 and benefiting countries with financial and health infrastructure restrictions. These findings emphasize the importance of research that seeks to establish new alternatives in the discovery of antiviral agents, contributing to the understanding of the importance of the evolution of products derived from natural compounds.

**Keywords:** SARS-CoV-2; COVID-19; ellagic acid; natural products.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Casos de COVID-19 e mortes global notificados pela OMS em intervalos de 28 dias.....	19
Figura 2	– Árvore filogenética contendo as primeiras cepas do vírus SARS-CoV-2.....	23
Figura 3	– Representação esquemática para o arranjo do genoma do SARS-CoV-2.....	25
Figura 4	– Estrutura do vírus SARS-CoV-2, detalhando a proteína S.....	25
Figura 5	– Ciclo viral do SARS-CoV-2.....	37
Figura 6	– Efeitos benéficos para a saúde dos compostos fenólicos naturais.....	34
Figura 7	– Representação gráfica da metodologia utilizada.....	36
Figura 8	– Representação do <i>screening</i> para a avaliação das moléculas candidatas.....	37
Figura 9	– A morfologia das células VERO em destaque.....	37
Figura 10	– Fluxograma representativo do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolium).....	41
Figura 11	– Fluxograma do ensaio de neutralização viral PRNT.....	44
Figura 12	– Viabilidade celular determinada por MTT na presença de diferentes concentrações de moléculas.....	51
Figura 13	– Teste de PRNT da titulação do SARS-CoV-2.....	53
Figura 14	– Ensaio de PRNT amostra+células e células+vírus.....	56
Figura 15	– Ensaio de titulação da molécula ácido elágico.....	57
Figura 16	– Estudo do IC50 do Ácido elágico.....	58
Figura 17	– Ancoragem molecular do ácido elágico contra a RdRp.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações máximas não tóxicas com até 30% de redução da viabilidade/estado metabólico de respiração celular – MTT.....	49
Tabela 2 – Porcentagens de redução da viabilidade celular das moléculas no ensaio de viabilidade celular – MTT.....	50
Tabela 3 – Ancoragem nos ligantes AC, AE e timol dos alvos moleculares do vírus SARS-Cov-2: RdRp, Spike e MPRO.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG	Ácido clorogênico
AE	Ácido elágico
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês: <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
COVID	Doença do coronavírus (em inglês: <i>coronavirus disease</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês: <i>Food and Drug Administration</i> )
MERS	Síndrome respiratória do oriente médio
MO	Microscópio óptico
NSP	Proteínas não estruturais (do inglês: <i>Non-structural proteins</i> )
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde (em inglês: <i>World Health Organization</i> )
PANGOLIN	Atribuição filogenética de linhagens de surto globais nomeadas (em inglês: <i>Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages</i> )
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês: <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PFU	Unidades formadoras de placas (do inglês: “ <i>Plaque formation units</i> ”)
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa (do inglês: <i>Plaque reduction neutralization test</i> )
PRRS	Síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos (em inglês: <i>Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome</i> )
RBD	Domínio de ligação do receptor RdRp (em inglês: <i>Receptor Binding Domain</i> )
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA viral RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SUS	Sistema Único de Saúde

## LISTA DE SÍMBOLOS

M	molar
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
g	Gramas
®	Marca Registrada
μ	Micro
M	molar
mm	Milímetro



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Evolução da pandemia de COVID-19 e seu impacto.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Aspectos gerais sobre a COVID.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Biologia do vírus SARS-CoV-2.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Alvos e estratégias para o desenvolvimento de antivirais.....</b>	<b>28</b>
<b>1.5</b>	<b>Novas moléculas da biodiversidade regional.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6</b>	<b>Compostos fenólicos.....</b>	<b>31</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Seleção e identificação das moléculas.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Obtenção e cultivo da linhagem celular.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Avaliação da viabilidade celular.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Avaliação da atividade antiviral.....</b>	<b>41</b>
<i>3.4.1</i>	<i>Local da experimentação e aspectos éticos.....</i>	<i>41</i>
<i>3.4.2</i>	<i>Obtenção do SARS-CoV-2.....</i>	<i>41</i>
<i>3.4.3</i>	<i>Isolamento viral.....</i>	<i>42</i>
<i>3.4.4</i>	<i>Titulação viral.....</i>	<i>42</i>
<i>3.4.5</i>	<i>Teste de neutralização viral.....</i>	<i>43</i>
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Ancoragem molecular.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2, com primeiro registro em Wuhan (China) em 2019, é o “novo coronavírus” responsável pela COVID-19. O contágio do SARS-CoV-2 ocorre principalmente por meio de secreções contaminadas, como gotículas respiratórias expelidas durante a fala, tosse ou espirro, além do contato com superfícies contaminadas (HU *et al.*, 2021). Essa forma de transmissão facilitada contribuiu significativamente para a rápida propagação do vírus em escala mundial, desencadeando a pandemia global de COVID-19 em 2020.

Em 4 de maio de 2020, mais de 3,3 milhões de casos de COVID-19 foram relatados, resultando em mais de 238.730 mortes em 215 países (WHO, 2020). Estatísticas de vigilância relatadas pelo *World corona tracker*, até 15 de fevereiro de 2024, relatam que a pandemia causou, 703.207.461 de casos de infecção confirmados, com mais de 6.983.297 de mortes no mundo (Worldometer, 2024). Pelo Painel Coronavírus, até 10 de fevereiro de 2024, a pandemia causou aproximadamente 38.374.307 milhões de casos de infecção confirmados, com 709.601 mil mortes no Brasil (Coronavírus Brasil, 2024). A doença é contagiosa e potencialmente fatal, especialmente para indivíduos com sistema imunológico enfraquecido, ou comorbidades associadas, como diabetes, pneumonia, doença cardíaca ou doenças imunossupressoras (WOROBAY *et al.*, 2022).

Para enfrentar a pandemia, enormes esforços de investigação têm sido dedicados ao desenvolvimento de vacinas e grandes entidades internacionais definiram a vacinação como sua principal prioridade (UN NEWS, 2021). Em todo o mundo, 0,9 bilhão de doses das vacinas foram administradas em 12 de janeiro de 2022. A imunização é eficaz na prevenção da infecção (YEK *et al.*, 2022) diminuindo sua gravidade (POLACK *et al.*, 2020). No entanto, os principais obstáculos para alcançar a imunidade coletiva incluem desigualdade na distribuição de vacinas, vacinas não eficazes, o surgimento de variantes de escape imunológico do SARS-CoV-2 e hesitação sobre a vacinação entre a população global. Como resultado, um direcionamento antiviral eficaz, convenientemente acessível e econômico ao SARS-CoV-2 é obrigatório, especialmente para países de baixa renda.

As pandemias causadas por vírus, como H1N1 e SARS-CoV-2, representaram uma grave ameaça à saúde pública global. No caso da COVID-19, o cenário é especialmente preocupante devido à ausência de fármacos cientificamente validados para o tratamento completo da doença (WEN *et al.*, 2022). Diante desse desafio, torna-se urgente a busca por estratégias eficazes e seguras de prevenção e controle da infecção, visando mitigar os impactos devastadores da pandemia.

A natureza é um excelente reservatório de compostos eficazes que podem ser usados diretamente como produtos farmacêuticos ou ainda desenvolvidos em novos medicamentos. Compostos naturais derivados de plantas têm sido usados na medicina ao longo da história e são considerados seguros em comparação com produtos sintéticos. Assim, uma avaliação rigorosa dos potenciais compostos naturais, envolvendo ensaios *in vitro* e posteriormente clínicos controlados para a produção de antivirais naturais eficazes é necessária. Dessa forma, isso pode levar a disponibilidade de medicamentos anti-SARS-CoV-2 a um custo razoável, servindo ao mesmo tempo como fonte de rendimento nos países de baixo rendimento. A disponibilidade de antivirais naturais pode desempenhar um papel essencial no apoio à COVID-19 no mundo, ajudando a tornar os cuidados de saúde mais acessíveis e sustentáveis.

Por sua vez, a riqueza da Biodiversidade Brasileira como fonte potencial de novas moléculas traz ao cenário uma importante contribuição ao fornecer novas moléculas em potencial para o controle de diferentes agentes patogênicos. Assim, um novo desafio que tem surgido para diversas áreas analíticas é o estudo da composição química de matrizes no seu estado bruto ou com um mínimo de pré-tratamento amostral. Esta abordagem visa encontrar “impressões digitais” (substâncias que discriminem as amostras) e/ou substâncias bioativas para a obtenção de informação química sem protocolos extenuantes de preparo amostral, o que aumenta a rapidez do processo, reduzindo seu custo.

Os produtos naturais têm demonstrado seu potencial como fonte de moléculas biologicamente ativas, inclusive com atividade antiviral contra diversos agentes patogênicos (VALLI; BOLZANI, 2019). Isso é evidente em diversos compostos farmacêuticos, que, embora formalmente de natureza sintética, são, na verdade, isómeros do substrato peptídico (como “imitadores de produtos naturais”), os quais são produzidos por métodos sintéticos e não pelo uso de fermentação ou extração para facilitar a recuperação (NEWMAN; CRAGG, 2020). De um relatório de 2018 de Andrew Liu publicado pela “Fierce Farmacêutica”, o medicamento mais vendido do últimos 25 anos é a atorvastatina (Lipitor), um hipocolesterolêmico descendente diretamente de um produto natural microbiano com vendas totais nos EUA de US\$94,67 bilhões. O próximo é o Humira biológico, com vendas de US\$75,78 bilhões. E em quarto é o Advair, combinação inaladora de um corticosteróide modificado e do agente beta-2-adrenérgico (uma combinação de dois compostos derivados de produtos naturais com uma modificação semi sintética), com vendas de US\$69,1 bilhões. Logo, observa-se em primeiro e quarto lugar derivados de moléculas de produto natural no gráfico de vendas dos EUA demonstrando o advento de novos produtos biológicos em protocolos de tratamento. Nota-se que as moléculas naturais oferecem as melhores opções para encontrar novos agentes/modelos

ativos, do que quando trabalhados em conjunto com químicos sintéticos e biólogos, oferecendo o potencial para descobrir novas estruturas que podem levar a agentes eficazes em uma variedade de doenças humanas (LIU, 2018).

Consideradas a relevância da pandemia e COVID-19; o impacto da doença sobre o Sistema de Único de Saúde – SUS; a necessidade de estratégias de enfrentamento para COVID-19; a identificação do advento das moléculas naturais como potenciais alvos para fármacos, e a biodiversidade brasileira como fonte de moléculas ativas, o presente trabalho contribui com a identificação de moléculas naturais capazes de inibir o SARS-CoV-2 e de neutralizar o vírus, empregando-os diretamente em ensaios *in vitro*. Certamente, este estudo auxilia no desenvolvimento de medicamentos eficazes e seletivos para o tratamento da COVID-19, bem como tem potencial de auxiliar a reduzir a dependência do país em insumos para a saúde.

### **1.1 Evolução da pandemia de COVID-19 e seu impacto**

Dezesseis anos após o surto da síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2003, o mundo testemunhou, em dezembro de 2019, um novo surto de pneumonia grave que emergiu na cidade de Wuhan, na província de Hubei, China. Posteriormente, foi confirmado que os pacientes estavam infectados por um novo agente, o coronavírus-2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). A maioria dos casos iniciais concentrou-se no centro de Wuhan, em particular nas proximidades do Mercado de Frutos do Mar de Huanan, onde, além de frutos do mar e aves, eram comercializadas espécies de mamíferos vivos, como guaxinins, texugos e raposas. Amostras ambientais coletadas no mercado continham o RNA do SARS-CoV-2, embora não houvesse relatos de testes em animais comercializados no local (WOROBNEY *et al.*, 2022).

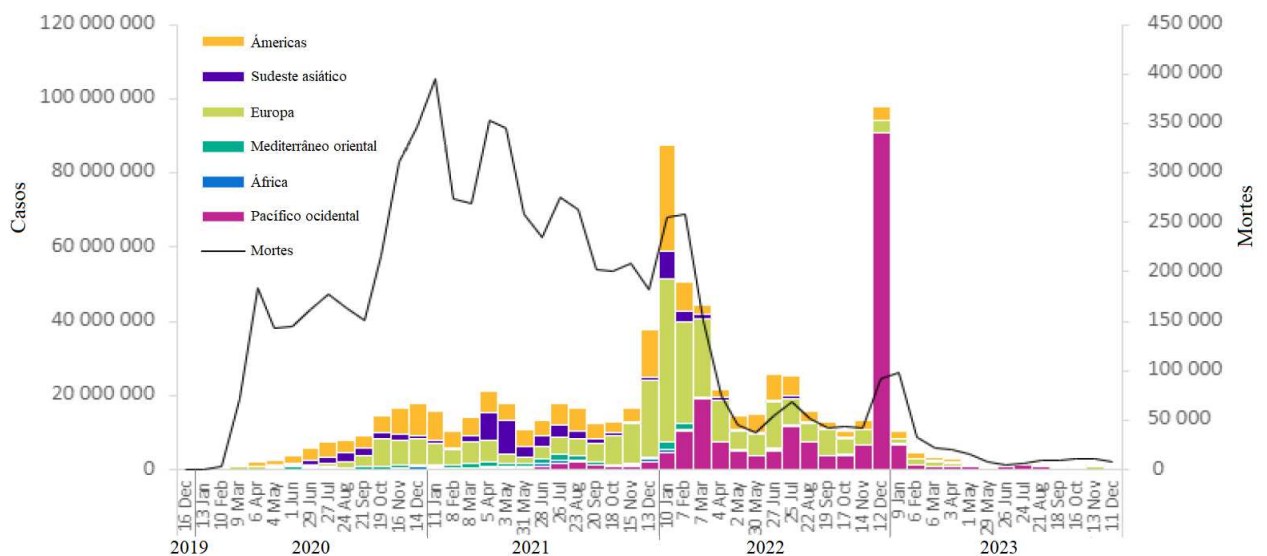
A origem exata do SARS-CoV-2 ainda está sob investigação, mas as evidências sugerem uma possível origem zoonótica, com a transmissão do vírus de animais para humanos, que potencialmente iniciou-se no Mercado de Frutos do Mar de Huanan (WOROBNEY *et al.*, 2022). É importante ressaltar que a pesquisa sobre a origem do vírus está em constante evolução, e novos dados podem fornecer mais informações desse surgimento.

A rápida disseminação internacional do vírus levou a uma pandemia declarada pela Organização Mundial da Saúde em março de 2020. No primeiro surto de 4 meses, até primeiro de abril de 2020, foram 823.626 casos confirmados e 40.598 mortes em 205 países e territórios. Até 27 de julho de 2020, 16.114.449 de infecções e foram registradas 646.641 mortes (WHO, 2020). O vírus se espalhou para quase todos os países, desencadeando medidas drásticas de contenção. Houve uma necessidade urgente de leitos hospitalares, ventiladores e equipamentos de proteção individual. Os impactos sociais, econômicos e nas rotinas diárias foram profundos,

resultando em *lockdowns*, desemprego em larga escala e perturbações nas cadeias de suprimentos.

O agravo sanitário causado pela pandemia da COVID-19 pode ser dimensionado pelos números de casos e óbitos confirmados pela doença globalmente. No Brasil, foi observada transmissão comunitária, com colapso do Sistema Único de Saúde em algumas regiões. De acordo com os dados da OMS, o Brasil foi o segundo país que mais registrou mortes pela doença sob a ótica de números absolutos. Quase 7 milhões de pessoas morreram devido a complicações da doença no mundo, tendo o Brasil representado cerca de 10% das notificações mundiais do Brasil (WHO, 2020 e 2023). Estima-se, ainda, que o total de mortes no mundo seja de ao menos 20 milhões (CHEN *et al.*, 2022). Na figura 1 o impacto mundial da COVID-19 nos últimos anos em números.

Figura 1 – Casos de COVID-19 e mortes global notificados pela OMS em intervalos de 28 dias



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde - “COVID-19 Epidemiological Update”. Atualização epidemiológica semanal sobre COVID-19 - 19 de janeiro de 2024. No último período de 28 dias (24 de julho a 20 de agosto de 2023), foram notificados quase 1,5 milhões de novos casos de COVID-19 e mais de 2.000 mortes nas seis regiões da OMS, um aumento de 63% de casos em comparação com os 28 dias anteriores. Atualmente, os casos notificados não representam com precisão as taxas de infecção devido à redução da realização de testes e notificações a nível mundial.

A pandemia de COVID-19 afetou em grande parte a comunidade científica, incluindo a consequência direta das medidas de confinamento e do encerramento da maioria das instalações de pesquisa universitária com ensaios não relacionados com a COVID-19. Em questão de meses, as universidades e instituições de pesquisa tiveram que redefinir e alocar

cuidadosamente atividades de pesquisa para o combate ao vírus, e toda a pesquisa não essencial inevitavelmente foi interrompida. Os periódicos científicos rapidamente já detalharam as características da doença e do próprio vírus. Inúmeros estudos foram conduzidos para identificar medicamentos eficazes, candidatos clínicos e moléculas-chave que demonstraram potencial atividade contra o SARS-CoV-2 ou que poderiam mitigar a tempestade de citocinas desencadeada pela infecção (ZEGGINI *et al.*, 2020).

## 1.2 Aspectos gerais sobre a COVID

A maioria das pessoas se infecta com os coronavírus ao longo da vida e apresenta infecções respiratórias brandas a moderadas de curta duração (CHENG *et al.*, 2007). Além das doenças respiratórias, o grupo é responsável por implicações entéricas, hepáticas e neurológicas, com comprometimento de leve a grave da saúde do hospedeiro (CHENG *et al.*, 2007). Essa diversidade destaca a complexidade e a importância de abordagens abrangentes na gestão da doença.

Embora as infecções por coronavírus geralmente sejam leves, nas epidemias por SARS-CoV em 2002 e MERS-CoV (do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome*) em 2012, mais de 10.000 pessoas foram infectadas, com taxas de mortalidade de 10% e 37%, respectivamente (HUANG *et al.*, 2020). Os sintomas da COVID variam, incluindo febre, tosse, fadiga, dispneia, dor de cabeça e perda de olfato ou paladar. A forma grave pode apresentar quadro clínico que varia de falta de ar, tosse paroxística, expectoração produtiva a opacidades multifocais em vidro fosco envolvendo os lobos pulmonares (KONG & AGARWAL, 2020). Grupos vulneráveis, como idosos e pessoas com comorbidades, enfrentam maior risco de complicações. De acordo com o CDC, 8 em cada 10 mortes relatadas nos EUA ocorreram em adultos com 65 anos ou mais (CDC, 2022). Uma metanálise retrospectiva incluindo 1.558 pacientes com COVID-19 foi realizada até 1º de março de 2020, em indivíduos com comorbidades subjacentes e o risco de adquirir COVID-19, observou-se que comorbidades comuns, como hipertensão, DPOC, diabetes e doença cardiocerebrovascular, são os fatores de risco mais significativos em indivíduos quando comparados com outros estados de doença subjacentes (WANG *et al.*, 2020). Assim, os desfechos da doença variam de casos assintomáticos até óbitos, sendo influenciados por diversos fatores a exemplo de idade, linfopenia, leucocitose e níveis alterados de bioquímicos e biomarcadores imunológicos (GUAN *et al.*, 2020).

Até o momento, não existem comprovações robustas que possibilitem a indicação de uma terapia farmacológica específica para a COVID-19 (LUI & GUARALDI, 2023). A

busca por alternativas no tratamento da COVID-19 tem sido objeto de vários estudos, abrangendo diversas classes de medicamentos. Entre eles, antivirais (HAN *et al.*, 2020; HOLSHUE *et al.*, 2020; KUJAWSKI *et al.*, 2020), corticosteroides (CHAN *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020), antimaláricos (CORTEGIANI *et al.*, 2020; GAUTRET *et al.*, 2020), e mesmo anti-hipertensivos, como inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores do receptor de angiotensina (DIAZ, 2021; LIU *et al.*, 2020; ZUMLA *et al.*, 2020), que já foram avaliados quanto à eficácia no tratamento da pneumonia por COVID-19 ou seus efeitos na evolução da doença. O reposicionamento de medicamentos existentes, incluindo o composto antiviral remdesivir e a dexametasona, trouxeram benefícios (WIERSINGA *et al.*, 2020), e outros medicamentos (molnupiravir, fluvoxamina e Paxlovid - nirmatrelvir + ritonavir) também mostraram uma promessa significativa (Wen *et al.*, 2022).

Contudo, destaca-se que a grande maioria dessas terapias não possui registro em bula para o uso específico em COVID-19, configurando-se muitas vezes como uso *off-label* (WIERSINGA *et al.*, 2020). Seis medicamentos estão autorizados para uso em pacientes com Covid-19 pela Anvisa, sendo a maioria ainda em caráter emergencial: Remdesivir (registro definitivo); Sotrovimabe (uso emergencial); Baricitinibe (indicação aprovada); Molnupiravir (uso emergencial); Paxlovid (uso emergencial) e Evusheld (uso emergencial) (PAGNO, 2023). Além disso, a eficácia dos medicamentos pode variar entre pacientes e em diferentes estágios da doença, bem como muitos medicamentos aprovados podem ter efeitos colaterais, e sua segurança a longo prazo pode não ser totalmente conhecida (FERREIRA & ANDRICOPULO, 200). É essencial monitorar outra limitação da produção ou distribuição, em que o uso de determinado medicamento numa doença nova pode afetar sua disponibilidade para todos os pacientes que precisam. Por fim, a COVID-19 é uma doença complexa, com manifestações variadas, na qual um único medicamento pode não abordar todas as facetas da infecção (BEIGEL *et al.*, 2020; CAVALCANTI *et al.*, 2020).

As vacinas demonstraram ser eficazes (KRAMMER, 2020) e seu desenvolvimento acelerado representou um marco significativo na resposta à pandemia, proporcionando uma medida crucial no controle da disseminação do vírus. Após 272 dias de pandemia declarada pela OMS, a fabricante Pfizer iniciou a aplicação de vacinas no Reino Unido (CASTRO; SINGER, 2021). Logo em seguida, várias vacinas contra a COVID-19 foram autorizadas para uso em diferentes partes do mundo, algumas das principais vacinas incluem: Pfizer-BioNTech (Comirnaty); Moderna (Spikevax), AstraZeneca-Oxford (Vaxzevria), Johnson & Johnson's Janssen (Janssen), Sinovac (CoronaVac) e Sputnik V, envolvendo desde tecnologias tecnológicas

de vetor viral (AstraZeneca, Johnson & Johnson's e Sputnik) , vírus inativado (Sinovac) e RNAs (Pfizer e Moderna).

Além das vacinas desenvolvidas e disponibilizadas à população, grupos de pesquisa buscam soluções para controlar o avanço da doença, baseadas nas evidências científicas relacionadas à estrutura molecular viral e à fisiopatologia da doença (GORDON *et al.*, 2020). Nesse sentido, estratégias de identificação de novas moléculas antivirais vêm sendo consideradas.

### 1.3 Biologia do vírus SARS-CoV-2

Filogeneticamente, o vírus SARS-CoV-2 está relacionado à família *Coronaviridae* e se agrupa com o SARS-CoV e outros coronavírus (CoVs) detectados em morcegos (por exemplo, RaTG13, RmYN02) e pangolins (originários, por exemplo, da província de Guangdong e Guangxi) (ANDERSEN *et al.*, 2020). Os coronavírus abrangem 2 subfamílias, 5 gêneros, 26 subgêneros e 46 espécies de vírus. O SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavirus*, subgênero *Sarbecovirus*, espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*. Essa classificação foi realizada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), considerando principalmente características moleculares e filogenéticas (CURRENT ICTV TAXONOMY RELEASE, [*s. d.*]). O SARS-CoV-2 é o sétimo coronavírus humano descrito, que também agrupa o SARS-CoV e o MERS-CoV (KO *et al.*, 2020).

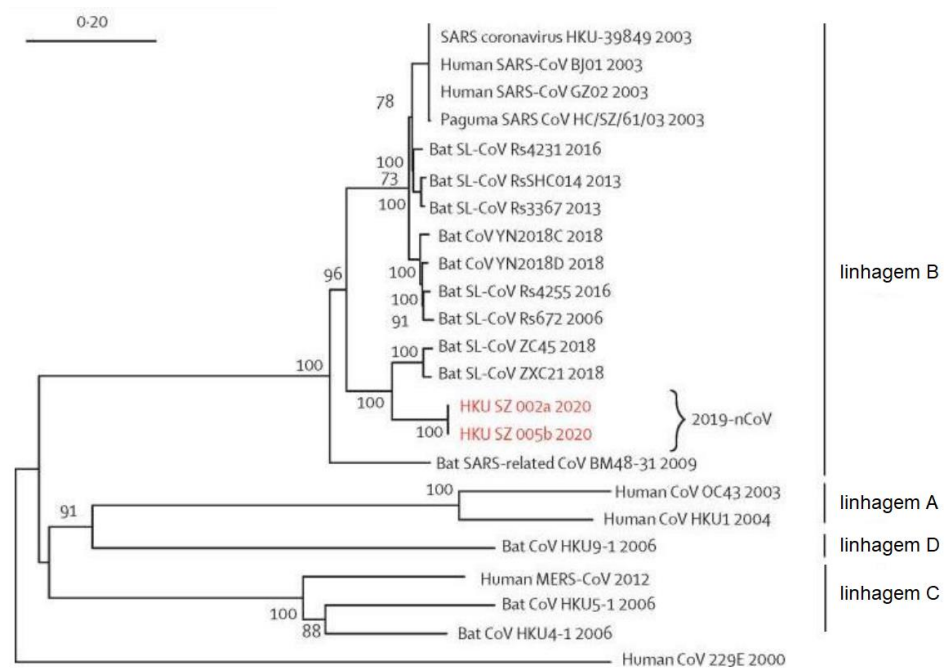
Em termos de similaridade genética, o genoma do SARS-CoV-2 é 79% semelhante ao SARS-CoV e compartilha 50% de identidade de sequência genômica com o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (TABIBZADEH *et al.*, 2020). Os CoVs derivados de morcegos, como RaTG13 e RmYN02, apresentam semelhanças de aproximadamente 96% e 93% com o SARS-CoV-2, respectivamente. A árvore filogenética mostrou que o vírus está localizado na linhagem B dos *Betacoronavirus* e está relacionado aos vírus SARS e SARS de morcego (Figura 2) (TABIBZADEH *et al.*, 2020). Uma característica notável do SARS-CoV-2 é encontrada na proteína S (*Spike*), onde cinco dos seis resíduos de aminoácidos dentro do domínio de ligação ao receptor (RBD) diferem do SARS-CoV. Além disso, há um sítio de clivagem polibásico na junção das subunidades S1 e S2 da *Spike*, permitindo uma clivagem mais eficaz por parte da furina e outras proteases (HU *et al.*, 2021).

As mutações adquiridas pelo vírus SARS-CoV-2 em escala global tiveram uma vigilância ampla e ágil com o avanço tecnológico no sequenciamento de nova geração. A evolução do vírus resultou no surgimento de variantes que podem ser resistentes aos medicamentos existentes, comprometendo a eficácia da identificação e do tratamento da



doença. Esse cenário tem sido marcado por um rápido desenvolvimento de variantes virais que, ao demonstrarem notável vantagem competitiva sobre as anteriores, tornam-se predominantemente prevalentes em todo o mundo. Uma das primeiras e mais notáveis mutações que impulsionaram a eficiência de transmissão foi a substituição ocorrida na proteína *Spike*, a mutação D614G, levando ao surgimento da linhagem PANGO B.1 (CARABELLI *et al.*, 2023).

Figura 2 – Árvore filogenética contendo as primeiras cepas do vírus SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Tabibzadeh *et al.*, 2021. Um dos primeiros estudos filogenéticos com o SARS-CoV-2, introduzindo a base para o sequenciamento do genoma e análise das primeiras infecções confirmadas por COVID-19 na China. O SARS-CoV-2 (em vermelho) é o 2019-nCoV, um novo coronavírus de 2019. Sendo as linhagens (A,B,C e D) definidas como entidades/organismos que compartilham um ancestral comum e apresentam mutações similares.

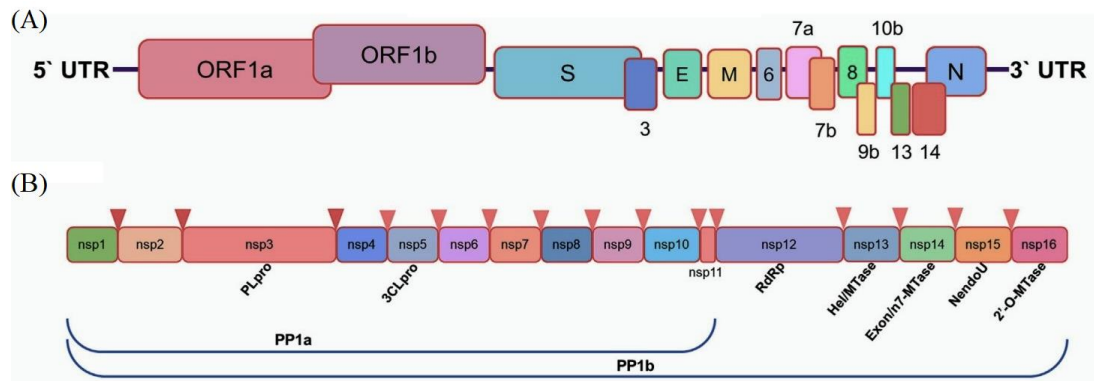
A OMS identificou algumas dessas variantes como "variantes de preocupação", que se disseminaram regional ou globalmente em um ritmo acelerado e, em muitos casos, exibiram uma maior habilidade para escapar da resposta imunológica do hospedeiro. Um exemplo foi a extinção da linhagem B.1 após o surgimento da variante *Alpha* (linhagem PANGO B.1.1.7). Pouco tempo após a detecção da variante *Alpha*, várias outras variantes notáveis surgiram, incluindo a variante Beta (B.1.351), a variante *Gamma* (P.1) e a variante Delta (B.1.617.2), cada uma com suas características distintivas, como a observação de uma clivagem aprimorada da furina nas variantes *Alpha* e Delta (KOELLE *et al.*, 2022).

Em 2021, ocorreu o surgimento da variante Ômicron (B.1.1.529) que evoluiu devido ao acúmulo de um grande número de mutações, especialmente na proteína *spike*, e

atualmente as mais recentes sublinhagens sequenciadas são Ômicron (KHANDIA *et al*, 2022). Observou-se que o risco de resultados graves após a infecção por SARS-CoV-2 foi substancialmente menor para o Ômicron do que para o Delta, com reduções mais elevadas para desfechos mais graves e variação significativa com a idade. Os afetados pela variante Ômicron tiveram um risco 60-70% menor de hospitalização e morte do que a variante delta segundo estudos na Inglaterra (NYBERG *et al*, 2022). Existem diversas teorias que explicam como a Ômicron reuniu um número tão elevado de mutações em menos tempo com maior transmissibilidade, maior evasão imunológica e desfechos menos graves, as quais envolvem a intensificação das campanhas de vacinação, o recebimento de doses de reforço, a realização de testes de eficácia de vacinas e imunoterapias contra variantes recentemente surgidas, a atualização das vacinas disponíveis, a concessão de vacinas multivalentes capazes de gerar imunidade híbrida, bem como a modernização de instalações médicas e a implementação rigorosa de medidas de prevenção e controle adequadas (KHANDIA *et al*, 2022).

A caracterização e a determinação da estrutura e organização genômica do SARS-CoV-2 podem auxiliar a entender o mecanismo de infecção e mutação viral. O genoma do coronavírus (de 29.903 nucleotídeos com cerca de 15 genes) é constituído por uma fita simples de RNA, não segmentada e com aproximadamente 26-32 kb, apresentando cap 5'-metilado e cauda 3'-poliadenilada (ABBASIAN *et al.*, 2023). A região codificante inclui os genes responsáveis pela replicação do genoma viral e os genes que codificam as proteínas estruturais (glicoproteína *spike* (S), proteína do envelope (E), proteína da membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N)) (GORBALENYA *et al.*, 2006). Na figura 3, observa-se a organização do gene: 5'- replicase ORF1ab (ORF do inglês – *Open Reading Frame*), S, E, M, N -3'. O SARS-CoV-2 apresenta pelo menos 9 proteínas acessórias (3, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 10b, 13, 14) também representadas na figura (ZHOU *et al.*, 2020). O gene ORF1ab é o maior segmento do genoma dos CoVs, sendo composto pela ORF1a e ORF1b, em que codificam as quatro proteínas estruturais essenciais.

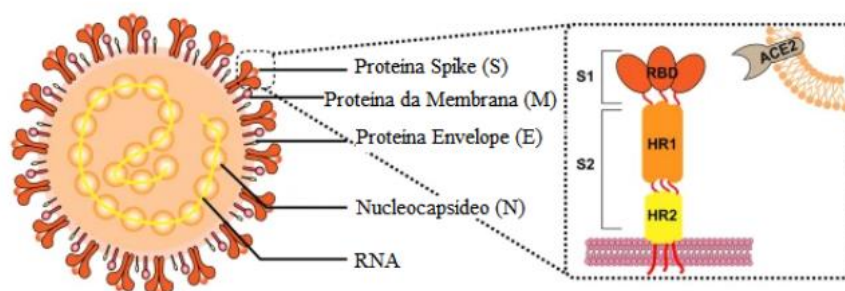
Figura 3 – Representação esquemática para o arranjo do genoma do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Kirtipal *et al.*, 2020. Em A: organização do genoma do SARS-CoV e em B: domínios funcionais no genoma do SARS-CoV. O genoma do SARS-CoV-2 codifica diversas proteínas não estruturais (ORF1a e ORF1b, que são processadas em NSP1-16) na extremidade 5', além de proteínas estruturais (S, E, M e N) e várias outras proteínas acessórias (ORF3a, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c e 10) na extremidade 3'.

Dentre essas proteínas estruturais, a glicoproteína S media a interação da partícula viral com um receptor na superfície da célula-alvo por meio de um domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês, *Receptor Binding Domain*) presente em sua subunidade S1 (Figura 4). A região S2 consiste em um peptídeo de fusão, responsável pela adsorção da partícula viral com a membrana celular, enquanto a proteína E, que é a menor de todas as proteínas, e que está presente no vírion em menor quantidade que as outras proteínas estruturais, está associada ao desencadeamento do processo de montagem da partícula viral e brotamento. A proteína M está presente em maior quantidade no envelope e desempenha um papel na montagem de partículas virais e determina o local de brotamento do vírus e a forma do envelope viral; sua interação com a proteína N estabiliza o nucleocapsídeo. A glicoproteína de espícula de CoVs forma homotrímeros projetando-se da superfície viral e mediando a entrada do genoma do vírus nas células hospedeiras (SRINIVASAN *et al.*, 2020).

Figura 4 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2, detalhando a proteína S

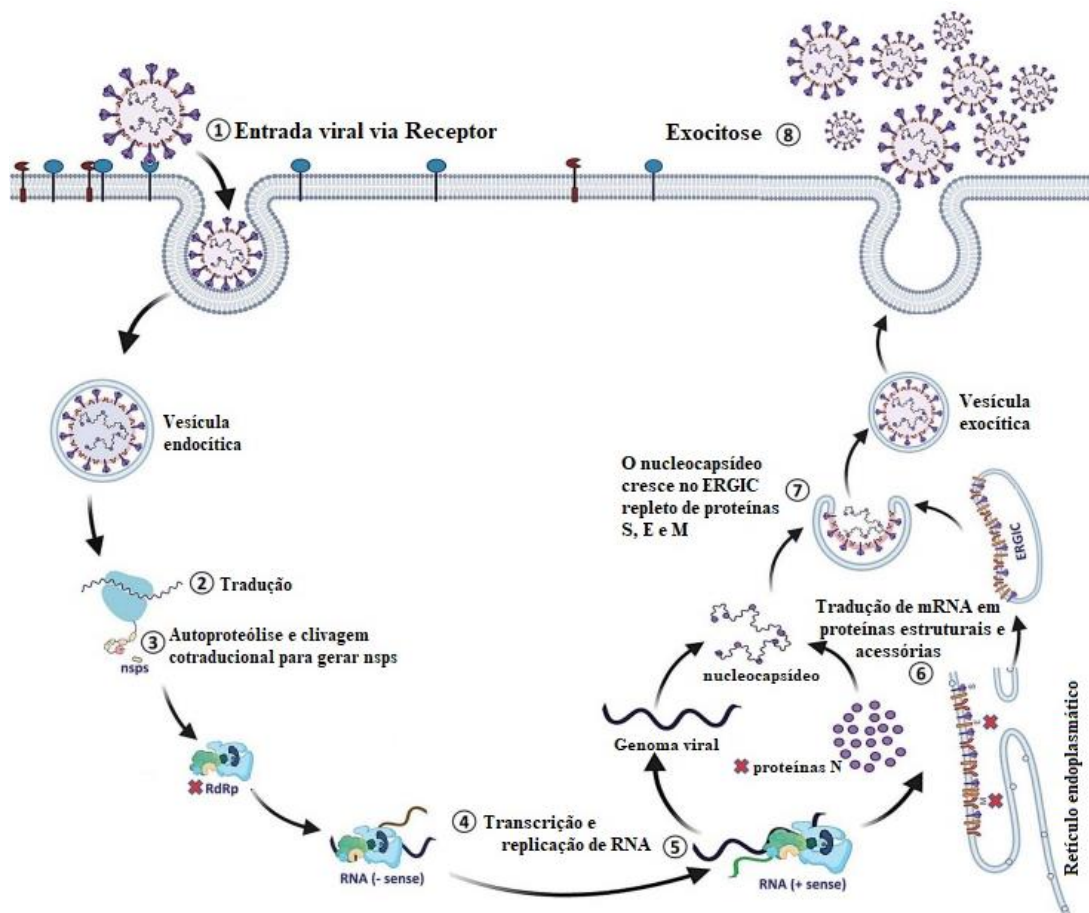


Fonte: Adaptado de ZHOU *et al* (2021).

Após a primeira etapa do ciclo de replicação dos coronavírus que consiste na adsorção, em que a região RBD da subunidade S1 da proteína S do virion interage com os receptores (que inclui a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2)) da célula hospedeira, são desencadeadas alterações conformacionais na subunidade S2 de S, culminando com a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira. O processo de entrada viral descrito pode ocorrer de forma independente (mediado pelas serino-proteases transmembranares 2 e 11D) ou dependente de endossomas, sendo a última via facilitada pelo baixo pH e pelas catepsinas endossômicas (SHANG *et al.*, 2020).

Posteriormente a entrada do vírus, a expressão do complexo replicação-transcrição ocorre de maneira muito similar ao SARS-CoV e ao coronavírus causador da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS*), os modelos mais estudados para a replicação dos coronavírus (MALIK, 2020). Após a fusão das membranas celulares, ocorre o desnudamento, em que o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma e o RNA viral torna-se disponível para a tradução como um mRNA e transcrição. A tradução inicia-se pelas ORF1a e ORF1b que irão codificar as poliproteínas pp1a e pp1ab, as quais vão ser clivadas nas NSPs (*non-structural proteins*). Essas poliproteínas formam um complexo RNA transcriptase-replicase, ocorre a transcrição da sequência inteira do genoma dando origem ao intermediário replicativo que irá servir de molde para síntese do RNA genômico, que será utilizado na montagem dos novos vírus. Em seguida ocorre a tradução das ORFs estruturais para dar origem às proteínas estruturais e acessórias. Os vírus recém-formados passam por uma fase de encapsulação, na qual são envolvidos por membranas celulares modificadas, adquirindo assim sua estrutura final. Após a montagem, esses vírus maduros são transportados para a superfície celular em vesículas e liberados para o meio extracelular por meio de exocitose (MALIK, 2020) (Figura 5).

Figura 5 – Ciclo viral do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de CHAKRAVARTI *et al* (2021). O SARS-CoV-2 entra nas células hospedeiras por fusão do endossomo na membrana plasmática, mediada pela proteína spike e ligação ao receptor ACE2. Após a entrada, o RNA viral é liberado, iniciando a tradução de poliproteínas clivadas em Proteínas Não Estruturais (NSPs) e proteínas estruturais. Um complexo forma-se para transcrever o genoma viral e produzir mRNAs e RNA subgenômico. As proteínas estruturais são traduzidas, encapsuladas no retículo endoplasmático e transportadas para o Reticulo Endoplasmático – Compartimento Intermediário de Golgi (ERGIC). Por fim, nucleocapsídeos e proteínas estruturais (spike - S, membrana - M, envelope - E, nucleocapsídeo - N) formam partículas de vírions exportadas por exocitose.

Destaca-se o papel das proteínas não estruturais produzidas pelas regiões nsp3 e nsp5, que codificam duas importantes proteases: a protease tipo papaína (PLpro) e a *3C-like protease* (3CLpro, também conhecida como M<sup>pro</sup>), respectivamente (BLANCK; ZIEBUHR, 2016). A primeira origina as poliproteínas replicase pp1a e pp1ab que compreendem as funções necessárias para a síntese de RNA viral, contudo, a clivagem dessas replicases acontece pela ação da M<sup>pro</sup> (cliva em 15 NSPs). Ambas proteases, junto com a enzima RNA polimerase

dependente de RNA (RdRp - nsp12) são imprescindíveis para o processo de replicação do SARS-CoV-2 (DONG *et al.*, 2020).

#### 1.4 Alvos e estratégias para o desenvolvimento de antivirais

O SARS-CoV-2 persiste na população humana, manifestando-se no surgimento contínuo de novas variantes com maior capacidade de evasão do sistema imunológico e maior eficiência de transmissão. A COVID-19 não parece estar erradicada, sugerindo a possibilidade de epidemias anuais. Nesse cenário, a vacinação regular de reforço se torna essencial para lidar com as novas variantes que possam surgir (DENG *et al.*, 2023). Essa estratégia visa manter a eficácia das vacinas existentes e fortalecer a imunidade da população contra as mutações do vírus. Nesse cenário inconstante, especialmente com parte da população não buscando o esquema vacinal completo (DUBÉ; MACDONALD, 2022), é necessário estudar estratégias de remediação.

Mesmo com medicamentos aprovados pela *Food and Drugs Administration* (FDA) como: Remdesivir, Sotrovimab, Baricitinib, Paxlovid e Monupiravir, ainda há restrição de uso em pacientes e alguns estão disponíveis apenas para uso hospitalar. Além disso, o custo mais elevado desses medicamentos pode representar um desafio para a ampla acessibilidade (PACL *et al.*, 2021). Essas limitações evidenciam a necessidade de ampliações no campo do tratamento para a COVID-19.

Para avaliar potenciais candidatos antivirais, foram empregadas diversas técnicas inovadoras, incluindo triagens de alto rendimento que utilizam pseudovírus, mini-replicons virais ou o próprio SARS-CoV-2 em instalações de alta contenção. Além disso, ensaios de interação enzimática e técnicas computacionais avançadas, como acoplamento molecular (*docking* molecular), aprendizado de máquina (*machine learning*) e estratégias baseadas em ligantes, foram empregadas para identificar uma ampla gama de possíveis tratamentos antivirais (ADAMSON *et al.*, 2021; BOBROWSKI *et al.*, 2020).

Vários estudos tentam identificar compostos naturais como inibidores virais *in vitro* de coronavírus. Compostos polifenólicos como a quercetina e a rutina em concentrações de 500–15.63 µg/mL inibiram o vírus em ensaios experimentais (CHIEW *et al.*, 2016); um extrato de sabugueiro silvestre com predominância de flavonoides exibiu capacidade inibitória *in vitro* com base em ensaio imunoenzimático competitivo (BORODUSKE *et al.*, 2021); cumarinas a partir de uma concentração de 50 µg/mL exerceram efeitos virucida e antiviral consideráveis *in vitro* (BAGGIERI *et al.*, 2023). Esses resultados destacam o potencial de compostos naturais como candidatos para o desenvolvimento de produtos anti-SARS-CoV-2.

Os coronavírus são reportados em termos da sua biologia molecular e possíveis alvos para a inibição do SARS-CoV-2. Desse modo, relata-se alguns alvos e diferentes estratégias para o desenvolvimento de antivirais.

- Proteína glicosilada *Spike* (S) e o receptor ACE2: A proteína S apresenta alta afinidade ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e parece mediar o processo de infecção viral. A expressão de ACE nos pneumócitos alveolares (HAMMING *et al.*, 2004) e a afinidade 10-20 vezes maior de S-SARS-CoV-2 ao receptor, comparado a S-SARS-CoV, parece justificar maior facilidade de transmissão e contágio do SARS-CoV-2 (WU *et al.*, 2020). Como o vírus utiliza o receptor ACE2 da célula hospedeira, esse se mostra um alvo válido para o desenvolvimento de medicamentos (BORODUSKE *et al.*, 2021).

- RdRp: A RdRp é a enzima mais conservada em diversas espécies virais, como vírus influenza, vírus da hepatite C (HCV), vírus Zika (ZIKV) e coronavírus (CoV), desempenhando o papel essencial no ciclo de vida desses vírus (AHMED-BELKACEM *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2018). A similaridade da sequência proteica entre SARS-CoV-2 e SARS-CoV RdRp é de até 96% e as disparidades estruturais existentes são encontradas na área cataliticamente inativa (MORSE *et al.*, 2020). Assim, moléculas antivirais de amplo espectro que atuam em RdRp podem bloquear a replicação viral de diferentes vírus de RNA.

- Proteínas virais que atuam na replicação do SARS-CoV-2: A M<sup>pro</sup> e a RdRp são indispensáveis para o ciclo de vida do vírus e desempenham um papel essencial na replicação viral. Portanto, considerá-las como alvos de drogas se tornou uma abordagem atraente para o desenvolvimento de possíveis medicamentos antivirais. Estudos apontam fármacos e compostos com derivados naturais com atividade antibacteriana e antiviral diante de uma alta afinidade para a M<sup>pro</sup>, bem como uma inibição da RdRp (WU *et al.*, 2020).

- Estratégias virtuais para o estudo de antivirais: No sentido de acelerar a descoberta de um antiviral, bem como para reposicionamento de drogas, a ancoragem ou atracamento (em inglês, chamado “*docking*”) molecular desempenha um papel essencial, fornecendo informações cruciais sobre a natureza e os detalhes das interações entre essas moléculas, o que, por sua vez, pode elucidar processos bioquímicos relevantes (LENGAUER; RAREY, 1996; SHAN *et al.*, 2011). O uso do método virtual inclui duas etapas, que podem auxiliar de forma significativa no reposicionamento e no desenvolvimento de novas moléculas anti-SARS-CoV-2. A primeira aborda a investigação da conformação e orientação do ligante no sítio de ligação, levando em consideração interações eletrostáticas, de *van der Waals* e a complementaridade de superfícies. Já a segunda etapa trata-se da previsão da pontuação de ligação, traduzindo a probabilidade de que uma determinada pose representa um modelo com

uma energia de ligação favorável. (GUEDES *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2015; JIMÉNEZ-GARCÍA *et al.*, 2018).

- **Produtos naturais:** A busca por uma terapêutica definitiva contra o SARS-CoV-2 desafia o domínio do reaproveitamento de medicamentos e das bibliotecas de compostos sintéticos, os produtos naturais como agentes antivirais e estimuladores imunológicos tornam uma alternativa relativamente barata e prontamente disponível (LOW *et al.*, 2023). Produtos naturais há muito tempo são reconhecidos por sua potente atividade antiviral, incluindo contra o MERS-CoV e o SARS-CoV (BHARADWAJ *et al.*, 2021). Estudos *in silico* já revelaram forte afinidade de vários produtos naturais com as proteínas não estruturais do vírus (BHARADWAJ *et al.*, 2021; SHALDAM *et al.*, 2021; SUPIAN *et al.*, 2022; SELIM *et al.*, 2023).

### **1.5 Novas moléculas da biodiversidade regional**

Durante períodos remotos, comunidades como quilombolas, indígenas e ribeirinhos empregaram o conhecimento popular sobre as propriedades curativas de plantas medicinais. Estas, reconhecidas como fontes de substâncias bioativas, desempenharam um papel fundamental na medicina popular, sendo utilizadas no tratamento de diversas doenças (BADKE *et al.*, 2011). E, atualmente, segundo a OMS, o uso da medicina tradicional está crescendo, nos países desenvolvidos se destaca como uso complementar e na África chega a 80% do uso na medicina (VALLI; BOLZANI, 2019), e os produtos naturais já representaram cerca de 60% de todos os medicamentos da medicina ocidental (PAN *et al.*, 2013). Esse acontecimento deve-se a grande diversidade química e potencialidade farmacológica das espécies. Mesmo que as substâncias bioativas isoladas não venham a se tornar fármacos, podem ser utilizadas como protótipos e originar compostos com aplicabilidade clínica (BADKE *et al.*, 2011).

Destaca-se o elevado potencial das plantas na síntese de diversas substâncias antimicrobianas, que desempenham papéis cruciais nos mecanismos de defesa contra estresses ambientais e bióticos (JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2018). Esses agentes antimicrobianos, como compostos fenólicos, polifenóis, terpenóides e alcalóides, têm sido ressaltados pela sua eficácia na proteção contra estresses, como radiação UV, seca, temperaturas extremas e ataques de microorganismos e herbívoros (JAMWAL; BHATTACHARYA; PURI, 2018; TAKSHAK; AGRAWAL, 2019; GAO *et al.*, 2020), o que pode ser de muito interesse para meio científico de modo a explorar de forma racional as propriedades intrínsecas dos metabólitos da biodiversidade brasileira.

Os produtos naturais têm demonstrado seu potencial como fonte de moléculas biologicamente ativas para seres humanos, inclusive com atividade antiviral contra diversos



agentes patogênicos, como por exemplo taninos que se mostraram eficientes contra o *Herpes simplex* vírus e vírus da influenza A (DERKSEN *et al.*, 2016). A avaliação de extratos vegetais contra o vírus SARS-CoV apresentou atividade antiviral moderada para potente nos ensaios de fracionamento, purificação e viabilidade, com destaque o extrato de *Lycoris radiata*, tendo o composto licorina como responsável pela atividade anti-SARS-CoV (LI *et al.*, 2005). O avanço na biotecnologia de plantas medicinais demonstra o uso de plantas medicinais e de seus constituintes na prevenção de diversas doenças (SOFOWORA; OGUNBODEDE; ONAYADE, 2013; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2020), o que impulsiona a indústria farmacêutica na busca de novos compostos bioativos.

Nesse sentido, o Brasil, abrigando o exclusivo bioma da Caatinga, com cerca de 800.000 km<sup>2</sup>, destaca-se por sua riqueza em espécies vegetais com metabólitos secundários de relevância terapêutica. (FILIZOLA; SAMPAIO, 2015). O estudo de plantas medicinais na Caatinga está em ascensão devido à diversidade química e ao potencial farmacológico das espécies, contribuindo para a busca de novos fármacos e protótipos clínicos. Essa fonte promissora de moléculas bioativas apresenta como exemplo o umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arruda Cam*), uma das espécies da caatinga mais ricas em compostos antioxidantes naturais, que estão presentes em sementes, frutas, folhas e raízes (AJILA; BHAT; PRASADA RAO, 2007). Nessa planta, estão descritos predominantes compostos fenólicos, que são pouco explorados (ZERAIK *et al.*, 2016), sendo escassa, sobretudo, a quantidade de informações e estudos acerca do potencial antiviral.

## 1.6 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem o grupo com maior número de representantes dentre os metabólitos secundários sintetizados por plantas (SWALLAH *et al.*, 2020). Eles são conhecidos como metabólitos sintetizados a partir do ácido chiquímico e policetídeos, cujas moléculas têm como característica a presença de um grupamento hidroxila (OH) ligado a um grupo de hidrocarboneto aromático (SWALLAH *et al.*, 2020). São importantes compostos observados em frutas, vegetais, chocolates, legumes, cereais e bebidas (GANESAN; XU, 2017) e estão presentes em todos os órgãos (frutos, sementes, raízes, cascas e folhas) das mais diversas plantas (TEPLOVA *et al.*, 2018).

Existem numerosas evidências químicas, bioquímicas, epidemiológicas e clínicas que indicam os efeitos benéficos dos compostos fenólicos sobre a saúde humana. Tal propriedade se dá, principalmente, pela capacidade de reagir com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e, assim, atuar como antioxidante - como demonstrado, sobretudo, em modelos

animais (BALU *et al.*, 2005; DAI; MUMPER, 2010; VAZQUEZ-ARMENTA *et al.*, 2022), diretamente relacionada à prevenção e/ou redução de doenças crônicas ligadas ao envelhecimento. Nesse sentido, eles também exercem diversos outros efeitos biológicos específicos, por meio de mecanismos de ação mais complexos, podendo assim apresentar eficácia quimiopreventiva (BARVE *et al.*, 2009; MANOHAR *et al.*, 2013); cardiovascular (MATTERA *et al.*, 2017); antimicrobiana (LIMA *et al.*, 2019); antiinflamatória (PORRO *et al.*, 2019); anticancer (KUNDUR *et al.*, 2019; XIONG *et al.*, 2019) e atividade antiviral (ZHAO *et al.*, 2017).

Os fenólicos, notáveis antioxidantes dietéticos, têm sido amplamente reconhecidos, e os ácidos clorogênicos, em particular, têm recebido atenção devido à sua distribuição abrangente e à sua presença na dieta humana, com potenciais efeitos biológicos (UPADHYAY; MOHAN RAO, 2013). O ácido clorogênico (ACG), também conhecido como ácido tânico do café e ácido 3-cafeoilquínico, é um composto solúvel em água produzido pelas plantas por meio da via do ácido chiquímico durante a respiração aeróbica (UPADHYAY; MOHAN RAO, 2013). O ACG é amplamente encontrado em plantas dicotiledôneas superiores, samambaias e muitas plantas da medicina chinesa (WANG *et al.*, 2022). Esses ácidos demonstram uma variedade de atividades farmacológicas, como exemplificado por Yu e colaboradores que destacaram a capacidade de flavonóides como potenciais inibidores da entrada do SARS-CoV-2 (YU *et al.*, 2020). Ademais, já foi demonstrado que o ACG retarda a absorção intestinal de glicose e inibe a gliconeogênese (ONG; HSU; TAN, 2012). Vale ressaltar que o ACG foi identificado como um potencial medicamento contra câncer, tendo sido aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos da China em fase I (NCT02728349, abril de 2016), depois em fase II (NCT03758014, Novembro de 2018) e em ensaios clínicos em pacientes com glioma (HUANG *et al.*, 2019).

Acerca da biodisponibilidade desses compostos, relata-se a absorção dos ácidos clorogênicos e de outros compostos fenólicos no aumento na capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos nestes compostos (MANACH *et al.*, 2005). Evidências foram obtidas por meio da quantificação das concentrações plasmáticas e/ou urinárias de ácidos clorogênicos após o consumo de alimentos com quantidades conhecidas dos mesmos ou da suplementação com os compostos isolados (NARDINI *et al.*, 2002; KONISHI; ZHAO; SHIMIZU, 2006; DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011; AUGUSTI *et al.*, 2021 ).

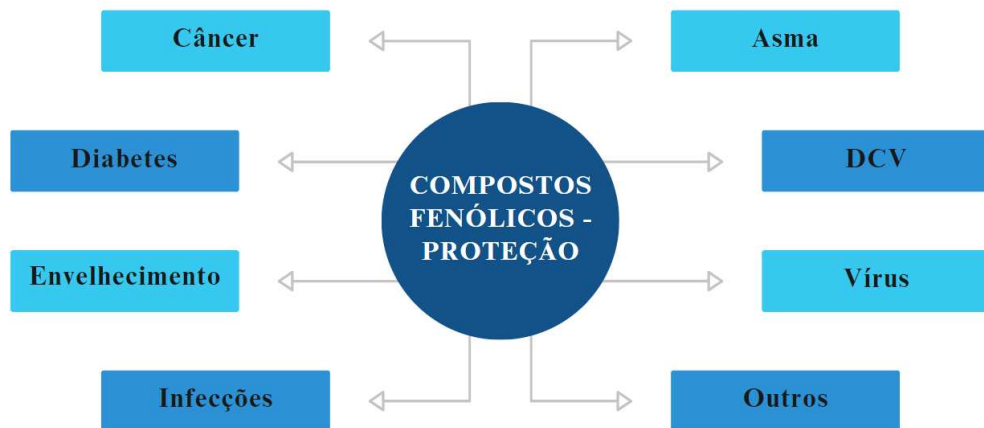
Dentre os compostos fenólicos, os taninos formam um grupo distinto, sendo definidos como polímeros fenólicos que estão unidos a um resíduo de glucose central, são solúveis em água e possuem massa molecular específica (RAHMAN *et al.*, 2021). Plantas ricas

em taninos podem ser usadas para o tratamento de diversas moléstias, como diarreias, pressão alta, reumatismo, hemorragias, feridas e problemas estomacais (YILDIRIM & KUTLU, 2015). Adicionalmente, vêm sendo utilizados contra os efeitos anti-séptico e inibitório da replicação do HIV (inibindo a transcriptase reversa, dificultando a replicação viral) (YILDIRIM & KUTLU, 2015).

As atividades farmacológicas dos taninos são derivadas, pelo menos em parte, dos taninos hidrolisáveis. Um exemplo é o ácido elágico que é encontrado em uma variedade de frutas, como morangos, framboesas, romãs e uvas, assim como em algumas nozes, como as castanhas e amendoim. Além disso, o ácido elágico (AE) é conhecido por sua capacidade de formar complexos com proteínas e outras moléculas, o que pode ter implicações em termos de atividade biológica e benefícios para a saúde como para a obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2, doença hepática e aterosclerose (KANG *et al.*, 2016). Em estudo, com ressonância plasmônica de superfície, foi identificada a inibição da Mpro do SARS-CoV-2 com base em elagitaninos (LI *et al.*, 2021). Outrossim, o AE inibiu a proliferação de células de câncer de pulmão com uma eficácia aproximadamente igual à do resveratrol, em que o tratamento de camundongos portadores de tumor com uso do AE resultou em inibição significativa do crescimento tumoral com supressão dos níveis de CIP2A e aumento da autofagia (DUAN *et al.*, 2019). Por outro lado, um tratamento com AE (25 e 50  $\mu\text{M}$ ) inibiu o estresse oxidativo induzido por Acrilamida que posteriormente levou à diminuição da citotoxicidade e dos danos mitocondriais, lisossômicos e de DNA (SALIMI *et al.*, 2021). Na figura 6 observa-se alguns dos benefícios destes compostos que foram exemplificados.

O timol, um monoterpene fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas como o tomilho, destaca-se como outro exemplo dentro do grupo diversificado dos compostos fenólicos (SHARIFI-RAD *et al.*, 2022). Além de contribuir para o aroma agradável do tomilho, o timol demonstrou propriedades antimicrobianas, incluindo atividade antiviral (NAGOOR *et al.* 2017). O timol pode inibir a replicação de alguns vírus, agindo diretamente sobre as partículas virais ou interferindo nos processos celulares necessários para a replicação viral, a exemplo de quando o Timol produziu um aumento significativo nos títulos de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle em frangos (HASHEMIPOUR *et al.*, 2013).

Figura 6 – Efeitos benéficos para a saúde dos compostos fenólicos naturais



Fonte: Adaptado de PANDEY *et al.*, 2009. Efeitos benéficos para a saúde pleiotrópicos dos compostos fenólicos naturais. Estudos epidemiológicos revelaram que os polifenóis fornecem uma proteção significativa contra o desenvolvimento de diversas doenças crônicas como doenças cardiovasculares (DCV), câncer, diabetes, infecções, envelhecimento, asma, vírus, etc.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

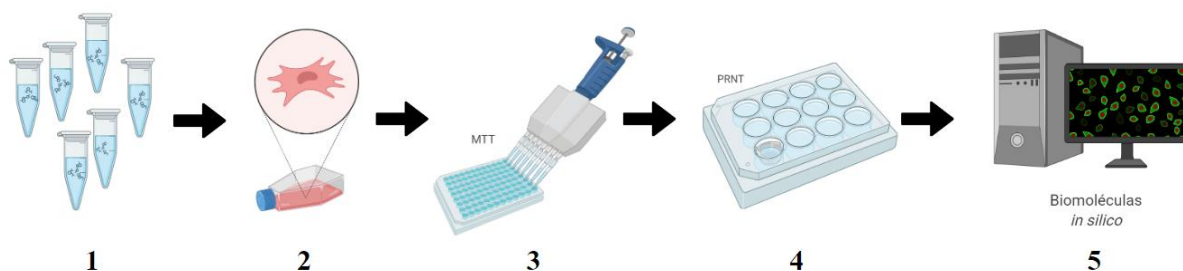
Identificar compostos fenólicos com potencial atividade antiviral ao SARS-CoV-2 com vistas à disponibilização de moléculas candidatas para posterior desenvolvimento de alternativas para o tratamento da COVID-19.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter um conjunto de moléculas candidatas anti-SARS-CoV-2 a partir de biblioteca química composta por um Banco virtual de moléculas – Plataforma Tropical DB, localizada no Laboratório de Química de Produtos Naturais – LMQPN, da Embrapa Agroindústria Tropical;
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* para moléculas selecionadas;
- Determinar o potencial de neutralização antiviral *in vitro* para moléculas selecionadas;
- Determinar a concentração inibitória IC50 para molécula com maior potencial de neutralização;
- Avaliar a afinidade *in silico* dos compostos, contra alvos importantes do SARS-CoV-2.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 7 – Representação gráfica da metodologia utilizada



Fonte: De autoria própria. *Abstract* gráfico da metodologia utilizada, em 1: Seleção e identificação das moléculas, em 2: Obtenção e cultivo da linhagem celular, em 3: Avaliação da viabilidade celular por MTT, em 4: Avaliação da atividade antiviral por PRNT e em 5: Ancoragem molecular.

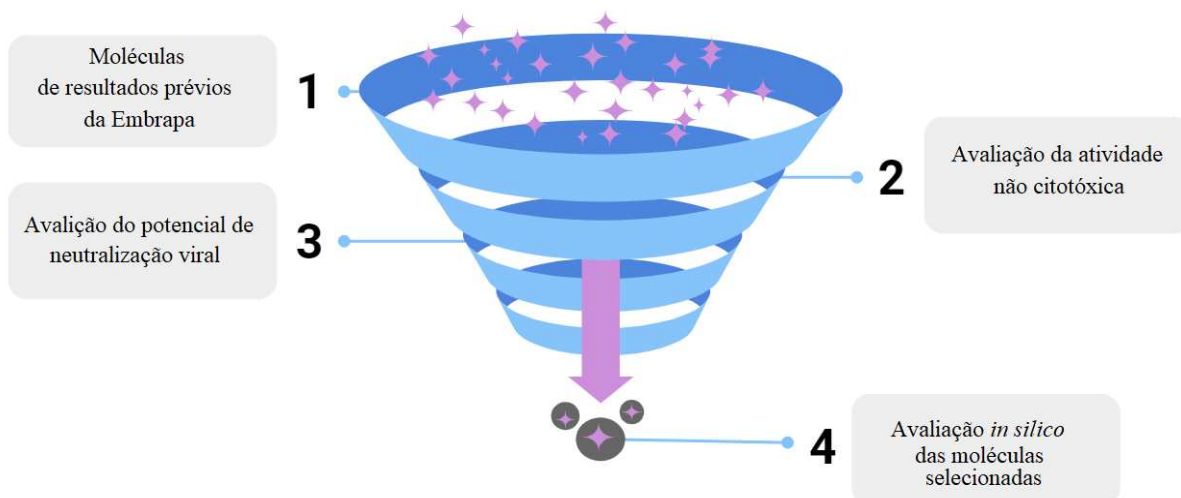
#### 3.1 Seleção e identificação das moléculas

As moléculas foram selecionadas da Plataforma Tropical DB da Embrapa Agroindústria Tropical, a qual possui 466 moléculas no total e não possui acesso aberto, sendo seus dados sigilosos. A seleção das moléculas ocorreu de maneira ampla a partir da ocorrência em espécies dos biomas brasileiros, teve como princípio norteador resultados prévios das moléculas do grupo de pesquisa da Embrapa Agroindústria Tropical para outros fins, assim como relatos na literatura científica quanto ao potencial desses compostos na atividade antiviral.

Tendo como referência a ocorrência natural em espécies do bioma brasileiro depositadas na Tropical DB, foram selecionadas dezoito moléculas para avaliação da atividade não citotóxica e determinação da potencial atividade antiviral contra o SARS-CoV-2: Ácido clorogênico, Ácido elágico, Ácido siríngico, Timol, Quercetina, Rutina, Ácido cafeico, Ácido gálico, Kaempferol, Naringenina, Ácido ferúlico, Ácido vanílico, Ácido p-coumárico, Ácido trans-cinâmico, Alfa-tocoferol, Catequina, Eugenol e Bisabolol. Destas 18 moléculas selecionadas pelo nosso grupo ocorreu uma triagem restringindo a apenas três.

De forma a assegurar a relação molécula x atividade antiviral, as moléculas utilizadas nos ensaios foram adquiridas comercialmente (Sigma-Aldrich, Brasil). Todas as substâncias foram dissolvidas em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração final de 10 mg/mL para estoque e armazenadas a -30 °C. As moléculas selecionadas foram desafiadas contra alvos do vírus SARS-CoV-2, em ensaios *in silico*, para identificar possíveis mecanismos de ação, conforme representado na figura 8.

Figura 8 – Representação do screening para a avaliação das moléculas candidatas

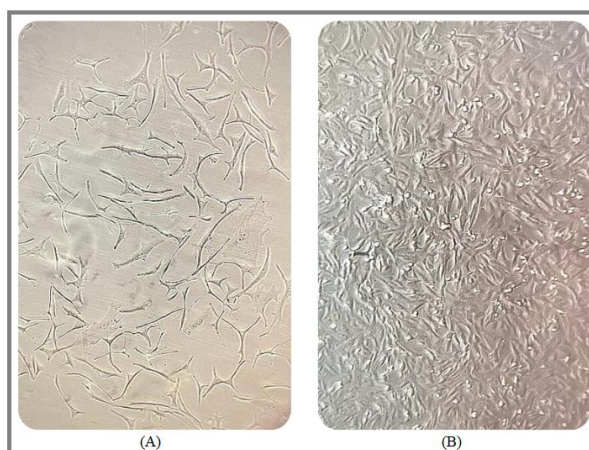


Fonte: De autoria própria. O processo pode ser definido em quatro passos dentro de um “funil”, em que as moléculas candidatas são selecionadas por meio de 1- resultados prévios do grupo/literatura, 2 - avaliação da atividade não citotóxica e 3 - avaliação do potencial de neutralização viral, para que em 4, com o “funil” finalizado, ensaios *in silico* para identificação de possíveis mecanismos de ação sejam realizados.

### 3.2 Obtenção e cultivo da linhagem celular

Foi utilizada a linhagem celular contínua VERO E6 (ATCC®) derivada do tecido renal de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto normal. A linhagem é certificada pela OMS como segura para a produção de vacinas para uso humano (WHO, 1987) e o SARS-CoV-2 pode efetivamente infectar e replicar-se na Vero E6 (STELZER-BRAID *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2021). A Figura 9 apresenta a morfologia de célula aderida. O cultivo celular foi realizado no Laboratório Multiusuário da Fiocruz Ceará.

Figura 9 – A morfologia das células VERO em destaque



Fonte: De autoria própria. Em (A), células VERO em baixa densidade; e em (B), as células VERO em alta densidade. Escala: 100 µm.

As células iniciais foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Estadual do Ceará. A preparação das células foi realizada seguindo a metodologia descrita pela ATCC - “*Animal Cell Culture Guide*”. O cultivo de células VERO foi realizado em meio Leibovitz’s (L-15) (Gibco, USA). O meio foi preparado acrescentando o soro bovino fetal (SBF) (LGC Biotecnologia, Brasil) estéril, inativado a 56 °C por 30 minutos, e antibiótico (100 U/mL de penicilina; 100 µg/mL de estreptomicina) (ATB) (Gibco, USA).

Para manutenção da linhagem celular VERO, foi utilizada inicialmente uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> para o descongelamento da linhagem, semeada com densidade 1 x 10<sup>6</sup> células/mL em meio de crescimento L-15 (20% SFB, 1% ATB), para formação da monocamada e confluência acima de 90%. No processo de descongelamento, uma ampola de células foi retirada do freezer -80 °C e colocada rapidamente em água a 37 °C e aguardado por 5 minutos, agitando lentamente a ampola sem atingir a tampa para que o descongelamento fosse uniforme. Após o conteúdo da ampola ser descongelado, este foi colocado em um tubo de centrifuga de 15 mL e adicionado 9 mL de meio de cultivo para retirar o resíduo de DMSO, o qual é tóxico para a célula. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 400 x g e, em seguida, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de meio completo. Antes de iniciar o repique, foi feita uma observação da monocamada e da morfologia das células no microscópio óptico (MO).

Após a observação microscópica, o meio de crescimento da garrafa foi descartado e a monocamada celular foi lavada com 2 mL de solução salina fosfatada (PBS), para retirada de inibidores e competidores que poderiam interferir na ação da tripsina (Gibco, USA) junto a ligações intercelulares. Em seguida, foram adicionados, suavemente, 1000 µL de tripsina 0,25% sobre a monocamada, agitando levemente a garrafa para espalhar a tripsina. O material foi incubado a 37 °C por 5-10 minutos para atingir a faixa de temperatura ótima da enzima e acelerar o processo de desprendimento das células na superfície da garrafa.

Após a tripsinização, foi acrescentado 2 mL do meio L-15 homogeneizando suavemente a suspensão celular, a qual foi centrifugada a 125 x g por 10 minutos. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em meio de crescimento L-15 (10% SFB, 1% ATB). As células foram transferidas para uma garrafa nova de 75 cm<sup>2</sup> completando o volume da garrafa com meio L-15 (10% SFB, 1% ATB) suficiente para 10 mL e agitando levemente para espalhar as células na superfície da garrafa. As garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, e foi feita a observação microscópica do crescimento celular após 24 e 48 horas.



Aproximadamente após 3 dias, a linhagem celular VERO foi submetida a primeira passagem ou o primeiro repique celular. As células mantidas em meio de crescimento L-15 (10% SFB, 1% ATB) e em garrafa (75 cm<sup>2</sup>) foram observadas para verificar a formação da monocamada e a morfologia das células no MO. Em seguida, o meio de crescimento L-15 foi descartado, lavado com 2 mL de PBS e, em seguida, foi utilizado 3 mL de tripsina (0,25%) para tripsinização. Foram efetuadas sucessivas batidas leves na garrafa com a mão, e 5-10 minutos de incubação a 37 °C para acelerar o desprendimento das células na superfície da garrafa. Após a incubação e mais sucessivas batidas na garrafa, as células desprenderam-se totalmente da superfície; foi adicionado à suspensão celular 6 mL do meio L-15, homogeneizando suavemente com a pipeta, evitando a formação de bolhas. A suspensão foi pipetada a um falcon, o qual foi centrifugado a 300 x g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em meio de crescimento - 3 mL de L-15 (10% SFB, 1% ATB). Foi adicionado cerca de 0,7 mL da suspensão celular em garrafas novas, completando o volume da garrafa com 10 mL do meio de crescimento L-15 (10% SFB), e agitando levemente para espalhar as células na superfície da garrafa. As garrafas foram incubadas em estufa a 28°C, e foi feita a observação microscópica do crescimento celular após 24 e 48 horas.

Após a ressuspensão, uma alíquota das células foi corada com azul de trypan (0,4%) (GIBCO), um corante vital em que as células vivas ou tecidos com membranas celulares intactas não são coloridos. Foi utilizada a diluição 1:1 (azul de trypan:células ressuscitadas) e realizada a contagem do número de células por mL com o auxílio de uma câmara de “Neubauer” de acordo com a fórmula:  $R = r \times 10^4 \times \text{taxa de diluição}$  (R = valor real da contagem de células / r = quantidade de células contadas nos grids) (ALVES *et. al*, 2010). Após o estabelecimento do número de células por mL nas garrafas, foram realizados os plaqueamento devidos para cada ensaio de acordo com a fórmula de diluição  $CV = C'V'$ . Foram cultivadas em placas de 24 poços 3 x 10<sup>5</sup> células/poço (para ensaio antiviral) e em placas de 96 poços 2 x 10<sup>5</sup> células/poço (para ensaio de citotoxicidade).

Ampolas de criopreservação de cada cultivo celular foram congeladas para usos posteriores. O processo de congelamento se deu pela utilização de 1 x 10<sup>6</sup> células/mL em ampolas crioprotetoras adicionado de 10% de DMSO como agente crioprotetor intracelular, a exemplo de 0,1 mL de DMSO para 0,9 mL de células na concentração determinada experimentalmente para um congelamento bem sucedido. Como o DMSO possui alta toxicidade em temperatura ambiente para as células, a adição sempre foi realizada de forma rápida, seguida de imediato congelamento a -80 °C, a fim de minimizar possíveis danos.

### 3.3 Avaliação da viabilidade celular

Células da linhagem VERO foram diluídas para a concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em meio Leibovitz L-15 (Cultilab, Brasil) com 2% de SBF e 1% de antibióticos (100 U/mL de penicilina; 100 µg/mL de estreptomicina), em incubadora a 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Para o ensaio 100 µL da diluição das células foram adicionados em cada poço de placas de 96 poços. Após o período de 24 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C (*Thermo Scientific Heracell*, VIOS 160i CO<sub>2</sub>) foram acrescentadas as soluções das substâncias a serem testadas nas diluições em meio Leibovitz L-15 com 2% SFB. As diluições foram realizadas partindo das moléculas em estoque (10 mg/mL) de forma seriada (1:2), com 8 pontos, variando a concentração dependendo de cada molécula, sendo a maior utilizada de 200 µg/mL e a menor de 0,390 µg/mL. Na tabela verifica-se as diluições utilizadas para as três moléculas triadas. Os poços controle não receberam as substâncias selecionadas.

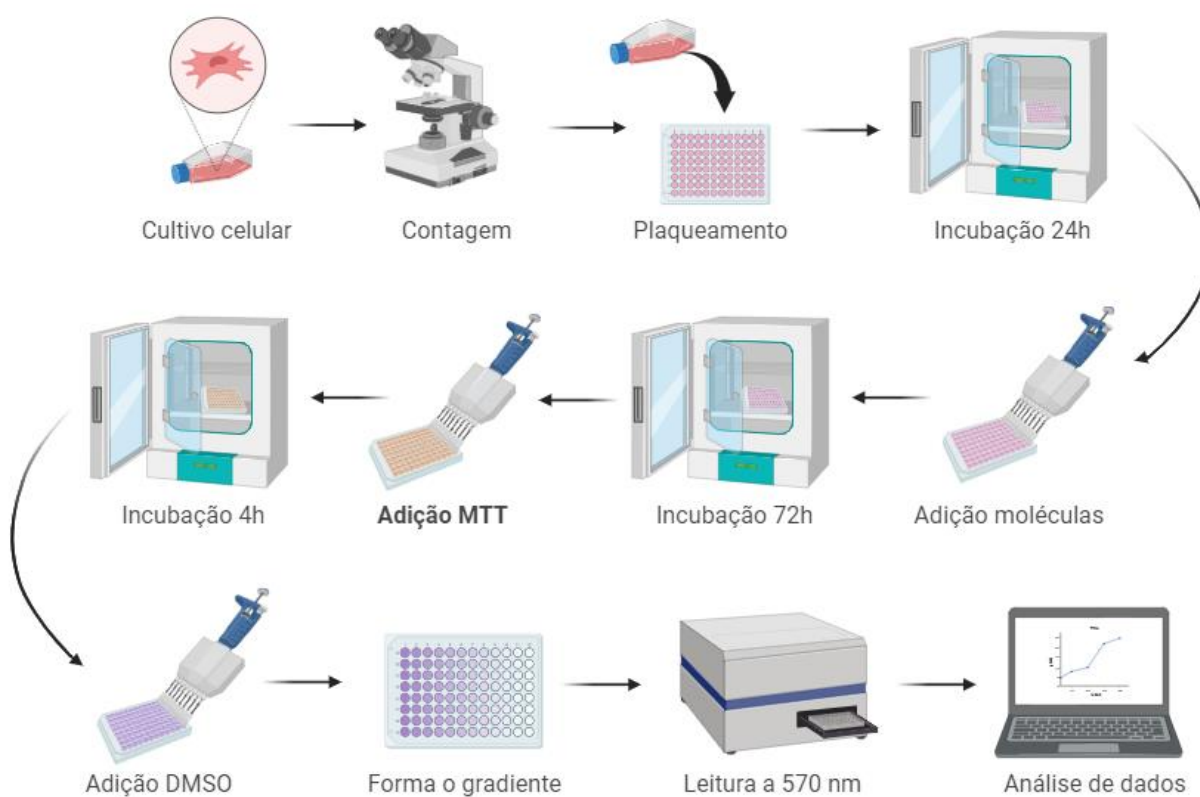
Tabela 1 - Diluições seriadas utilizadas no ensaio de MTT

Molécula	Diluições
Ácido clorogênico	200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL, 1.562 µg/mL, 0.781 µg/mL e 0.390 µg/mL
Ácido elágico	50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL, 1.562 µg/mL, 0.781 µg/mL e 0.390 µg/mL
Timol	50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL, 1.562 µg/mL, 0.781 µg/mL e 0.390 µg/mL

Fonte: De autoria própria. O ácido clorogênico necessitou da realização de mais ensaios com diluições maiores que as outras moléculas.

As células foram incubadas com as moléculas por 72 horas em estufa a 37 °C. Após esse período, adicionou-se 20 µL de solução MTT (0,5 mg/mL). A placa permaneceu por 4 horas na estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min, MTT foi removido e os cristais de formazan diluídos com 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. A placa foi submetida a agitação por 5 minutos e lida a 570 nm no leitor de placas (Multiskan FC), conforme representado na figura 10 (MOSMAN, 1983).

Figura 10 – Fluxograma representativo do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolium)



Fonte: De autoria própria via *biorender*.

### 3.4 Avaliação da atividade antiviral

#### 3.4.1 Local da experimentação e aspectos éticos

Toda a manipulação do vírus SARS-CoV-2 foi realizada no laboratório NB3 do Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (Lacen) em Fortaleza, Ceará. Inicialmente, a pesquisa foi submetida e aprovada no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (CEP) - número do protocolo 5.528.975.

#### 3.4.2 Obtenção do SARS-CoV-2

A obtenção do vírus ocorreu por meio do esfregaço nasofaríngeo coletado de um paciente do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce), que foi submetido ao diagnóstico de Covid-19, conforme descrito por Holshue *et al.* (2020). O esfregaço nasofaríngeo foi coletado no início dos sintomas e colocado em 3 mL de meio de transporte viral do kit usado para diagnóstico molecular. A amostra foi testada para SARS-CoV-2 por RT-PCR no Hemoce utilizando o TaqPath™ COVID-19 Combo Kit (ThermoFisher®), em seguida, foi alíquotada e congelada a -20 °C até o isolamento do vírus.

### 3.4.3 Isolamento viral

Após 11 dias da coleta da amostra do paciente ocorreu o isolamento viral. As células VERO confluentes  $\geq 90\%$  em monocamada cultivadas em frascos foram infectadas com SARS-CoV-2 e incubadas em estufa a 37 °C. Durante o período de infecção e replicação viral foram realizadas duas coletas (200  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante, uma no dia 5 e outra no dia 7 após a infecção, para verificar a multiplicação do vírus por RT-PCR no Hemoce. Os frascos foram monitorados diariamente por microscopia óptica observando a perda de aderência das células. As suspensões de células-vírus foram centrifugadas a 1.500 g por 10 min. Os sobrenadantes foram distribuídos em volumes de 1 mL em frascos criogênicos pré-rotulados e os *pellets* foram descartados. Os frascos criogênicos foram colocados em um freezer -80 °C. Esses criotubos foram nomeados como alíquotas de vírus de uso único para procedimentos de PRNT, o vírus ficou estável durante pelo menos 6 meses quando preparado e armazenado desta maneira.

Para determinar a variante, um segundo criotubo foi encaminhado para o sequenciamento realizado pelo Grupo de Vigilância Genômica da Fiocruz-CE, utilizando o kit CovidSeq™ adaptado pela Rede Genômica Fiocruz.

### 3.4.4 Titulação viral

Para a determinação da concentração de vírus viáveis se utilizou a técnica de formação de placas para quantificar as unidades formadoras de placa - PFU, utilizando o protocolo descrito previamente por BEWLEY *et al.*, 2021.

As células VERO E6 foram cultivadas em placas de 12 poços e incubadas a uma temperatura de 37 °C em um meio de cultura L-15 enriquecido com 2% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de antibióticos de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Uma vez que as células atingiram uma confluência de 90-100%, elas foram lavadas com uma solução de PBS com pH 7,3. Posteriormente, uma alíquota do estoque viral foi cuidadosamente descongelada e submetida a uma diluição em série decimal ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) em meio L-15 livre de soro fetal bovino. Em seguida, 250  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram adicionados em duplicata aos poços da placa, que foi então incubada por 1 hora a 37 °C, garantindo uma homogeneização a cada 15 minutos.

Após a incubação, as soluções dos poços foram removidas e substituídas por 1 mL de um *overlay* contendo 1% de carboximetilcelulose em L-15 suplementado com 2% de FBS e 1% de antibióticos de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Após um período de incubação adicional de 72 horas a 37 °C, 1 mL de formaldeído a 3,65% em PBS foi adicionado aos poços. Após 1 hora de incubação, a mistura foi cuidadosamente removida e as células foram coradas

com uma solução de 0,5% de cristal violeta por um período de 5 a 15 minutos. As placas foram então lavadas com água, digitalizadas e analisadas utilizando o programa ImageJ® para uma contagem individualizada das placas de cada poço.

A titulação do vírus foi realizada contando-se as placas formadas em uma das diluições de acordo com a fórmula: Título =  $P \times F \times 10^X$  (PFU/mL), onde P representa a média do número de placas obtidas na diluição selecionada, F é o fator de correção para expressar o título em PFU/mL (calculado como 1000µL dividido pelo volume do inóculo) e  $10^X$  é a diluição na qual as placas foram contadas. (BEWLEY *et al.*, 2021)

### 3.4.5 Teste de neutralização viral

Para avaliar a capacidade inibitória das moléculas na replicação do SARS-CoV-2 *in vitro*, foi realizado o teste de neutralização por redução de placa (PRNT). As células VERO foram distribuídas em placas de 24 poços a uma concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL em meio Leibovitz (L-15) suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) um dia antes do experimento.

As amostras foram diluídas até atingirem a maior concentração que reduz a viabilidade celular e o estado metabólico em até 30% (RVC30%) em meio L-15 puro, conforme determinado pelo teste MTT. Em seguida, as moléculas foram misturadas com 60 unidades formadoras de placa (PFU) do vírus SARS-CoV-2, variante delta, e incubadas por 1 hora a 37 °C. Após o período de incubação, 200 µL da mistura molécula/vírus foram adicionados em duplicata aos poços da placa de 24 poços e incubados por mais 1 hora a 37 °C, agitando-se cuidadosamente a cada 15 minutos.

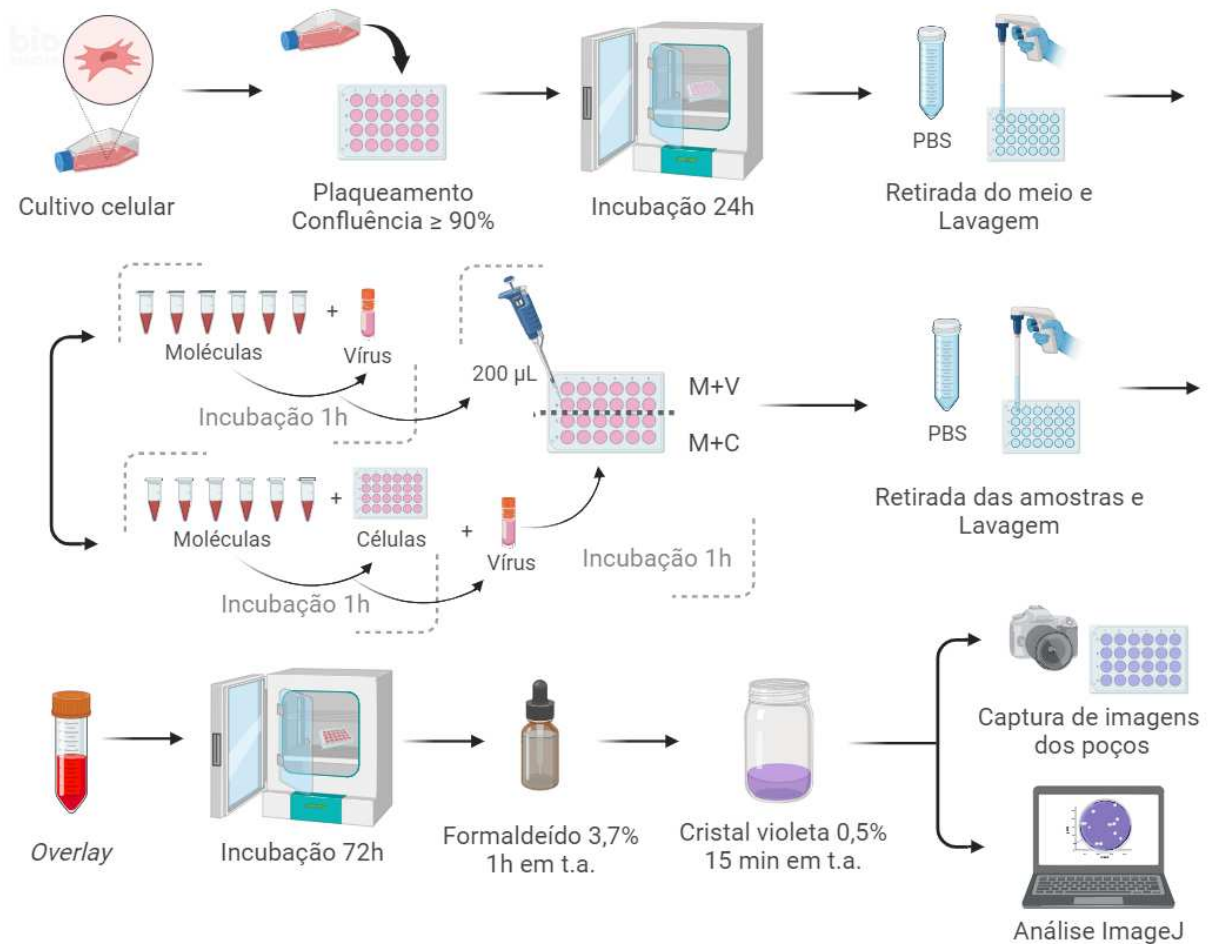
Paralelamente, as amostras também foram incubadas apenas com as células por 1 hora a 37 °C. Em seguida, os poços que receberam as amostras foram lavados com PBS pH 7,3 e, imediatamente após, foi adicionado 60 PFU do vírus SARS-CoV-2 e novamente incubado por 1 hora a 37 °C, com agitação a cada 15 minutos. Dois poços receberam apenas o vírus como controle positivo.

Após o tempo de incubação, as amostras foram removidas da placa e imediatamente acrescentado 500 µL de *overlay* (L-15 com 2% SFB, 1% de antibiótico e 1,5% de carboximetilcelulose). Após 72 horas de incubação a 37 °C, as células foram fixadas com formaldeído a 3,7% por 1 hora. Em seguida, o *overlay* foi removido e as células foram coradas com cristal violeta a 0,5%.

Os poços foram digitalizados e as placas contadas com o auxílio do programa ImageJ®. Fluxograma representativo da metodologia da técnica pode ser observado na Figura

11. A porcentagem de neutralização foi calculada utilizando a fórmula:  $PRNT\% = (\text{média da amostra} \times 100 / \text{média do controle}) - 100$ .

Figura 11 – Fluxograma do ensaio de neutralização viral PRNT



Fonte: De autoria própria pela autora via *biorender*. M+V: moléculas mais vírus, M+C: moléculas mais células, t.a.: temperatura ambiente. As setas duplas indicam o acontecimento em paralelo.

O  $IC_{50}$ , definido como a concentração da amostra que corresponde a 50% de atividade normalizada (ou 50% de redução/inibição da infecção), foi calculado apenas para as moléculas que apresentaram inibição viral superior a 50%. Para isso, diluiu-se a molécula correspondente ao resultado viral determinado em 5 vezes de forma seriada com fator 2 em meio L-15 puro, iniciando na determinada RVC30%, obtida no ensaio MTT. A metodologia foi a mesma descrita anteriormente (item 3.4.4), com exceção de que foram realizados três experimentos independentes.

### 3.5 Análise estatística

Os valores do ensaio de MTT foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes com triplicata em uma tabela e plotados em gráfico. A viabilidade celular foi calculada pela normalização por faixa percentual, considerando a média do controle Branco (somente células) como o valor de “0%”. Para o cálculo da redução da viabilidade celular foi realizada uma transformação dos dados ( fórmula “ $Y=100-Y$ ”).

Os resultados do PRNT foram demonstrados em média  $\pm$  desvio padrão e analisados comparando-se dois experimentos independentes com duplicatas. Os testes paramétricos feitos nos grupos tratados e controle utilizaram teste t de Student e a análise de variância (*One-way ANOVA*) utilizando o programa GraphPad Prim® 8.0.2. Foi utilizado  $p < 0,05$  como referência de significância. O  $IC_{50}$  foi determinado utilizando a equação dose-resposta – inibidor: log inibidor versus normalização da resposta - variável *slope* do programa GraphPad Prism® 8.02.

### 3.6 Ancoragem molecular

Simulações de ancoragem molecular foram realizadas com compostos selecionados (ácido clorogênico, ácido elágico e timol) e três alvos virais em parceria com o Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical. As estruturas proteicas 3D de alvos proteicos foram recuperadas do Protein DataBank (MORRIS *et al.*, 2009). As proteínas são codificadas como 6VYB para a estrutura do ectodomínio do pico SARS-CoV-2 (estado aberto) (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005), 6LU7 para a estrutura cristalina da protease principal em complexo com um inibidor N3 (M<sup>pro</sup>) (LUIZ *et al.*, 2018), 6M71 para RdRp.

O docking molecular na presença de ácido clorogênico (CID 1794427), ácido elágico (CID 5281855) e timol (CID 6989) foi realizado o servidor web DockThor (<https://www.dockthor.lncc.br/v2/>) adotando o campo de força CHARMM36. O software Openbabel (KHAN *et al.*, 2022) foi usado para converter os códigos *smile* de cada ligante em um arquivo no formato PDB para ser usado como entrada no DockThor.

Foram utilizados estados de protonação padrão de cada proteína, com base no pH neutro, e as cargas foram atribuídas com base no padrão de acordo com os parâmetros de aquisição da grade do DockThor . A configuração padrão foi usada com 500 mil avaliações e 12 execuções para cada ligante geraram as poses de acoplamento. Para realizar um cálculo de ancoragem molecular na plataforma DockThor (DockThor, 2023), foram submetidos os arquivos com as estruturas da macromolécula (alvo biológico) e ligante (candidato a fármaco)

para, posteriormente, definir a região do sítio ativo da macromolécula, que será o local onde ocorrerá a busca pela conformação mais estável para o complexo.

A previsão de afinidade e a classificação de complexos proteína-ligante foram realizadas com DockTScore, que é uma função de pontuação empírica linear que leva em consideração termos importantes para a ligação proteína-ligante, como interações intermoleculares, entropia do ligante e dessolvatação (SCHUMACHER *et al.*, 2018).

Além disso, o software ChimeraX (PETTERSEN, 2021) foi usado para a visualização da representação gráfica, bem como ligações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e seus comprimentos de ligação e interações da cadeia de aminoácidos em cada pose de encaixe.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os compostos avaliados na Plataforma Tropical DB, o presente estudo selecionou moléculas candidatas pertencentes à classe dos compostos fenólicos, tendo como princípio norteador para essa seleção resultados da literatura que citam o potencial desses compostos para atividade antiviral. Para o presente estudo foram selecionados o Ácido Clorogênico, Ácido Elágico e o Timol.

### 4.1 Análise de viabilidade celular

Os ensaios *in vitro* são uma alternativa para avaliações de toxicidade de muitas substâncias (BERNAUER *et al.*, 2005) e estudos detalhados de concentrações e de tempo de exposição das células a essas substâncias podem sustentar informações valiosas sobre o mecanismo e tipo de toxicidade celular provocados por essas (EISENBRAND *et al.*, 2002). A utilização desses ensaios apresentou aumento expressivo em todo o mundo nos últimos anos, especialmente com o uso de células VERO (KIESSLICH; KAMEN, 2020).

O teste de MTT é uma abordagem comumente utilizada para avaliar a viabilidade celular, conseguindo, assim, abordar a citotoxicidade *in vitro* (PERES *et. al.*, 2008). Ele permite observar o crescimento, a reprodução e os efeitos morfológicos das células quando expostas a diferentes compostos. A avaliação da viabilidade celular desempenha um papel crucial na avaliação da toxicidade, sendo o teste de MTT escolhido devido à sua simplicidade, rapidez e alta sensibilidade. Os compostos testados podem exercer citotoxicidade por meio de vários mecanismos, como destruição de membranas celulares, inibição da síntese de proteínas, ligação irreversível a receptores, inibição de polidesoxinucleotídeos e interferência em reações enzimáticas. Este método fornece uma ferramenta valiosa para quantificar os efeitos dos compostos em células *in vitro*. (LI; ZHOU; XU, 2015)

A redução do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis forma como produto o azul de Formazan, o que torna possível uma análise da viabilidade e do estado metabólico da célula. A produção de formazan, e a sua densidade óptica, refletem o estado funcional da cadeia respiratória, que é proporcional ao número de células metabolicamente ativas em cultura (MOSMAN, 1983). O produto formado pode ser dissolvido em um solvente e sua quantificação é realizada por meio da medição da absorvância, utilizando um espectrofotômetro.

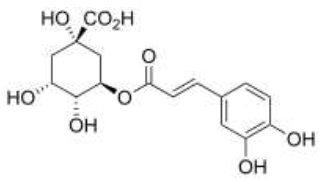
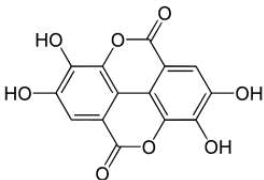
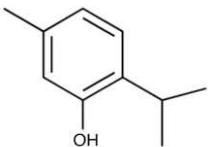
Em um formato de 96 poços, as células VERO têm uma taxa de crescimento reduzida no meio de ensaio (tempo de duplicação de 48h), o que pode contribuir para a

estabilidade do ensaio, diminuindo os artefatos induzidos pela rápida metabolização das células. Os resultados analisados pelo ensaio de MTT foram representados em redução da viabilidade celular (RVC) (PEREIRA *et al.*, 2016) tendo em vista que a avaliação não fornece nenhuma visão sobre o mecanismo de ação, podendo ser um mecanismo intrínseco da molécula (citotoxicidade) ou um mecanismo em torno celular (BERRIDGE *et al.*, 1996). Também foram determinadas as concentrações máximas que reduzem a viabilidade e o estado metabólico celular em até 30% ([RVC30%]), as quais foram o “*cut off*” para o ensaio de neutralização celular.

A determinação da porcentagem de 30% se deve por ocorrer causas externas ao uso da molécula adicionada. Nesse sentido, a letalidade pode ocorrer devido a outros fatores não decorrentes das substâncias adicionadas, como esgotamento de nutrientes do meio de cultivo ou alteração do pH do meio e outros fatores decorrentes do grande período de incubação (ROMERO *et al.*, 2004; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; WANG *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi considerada como 10% a inibição da atividade ou letalidade celular decorrente do uso do solvente DMSO, valor aproximado que é observado no controle em que foi usado somente o DMSO (foi encontrado RVC = 11,84% quando o DMSO foi testado como controle negativo, sendo utilizado no volume igual ao que foi usado na maior concentração da curva do teste, ou seja, o maior volume de DMSO), totalizando, assim, 30%.

A concentração RVC30% para o ácido clorogênico foi de 100 µg/mL; para o timol de 25 µg/mL e para o ácido elágico de 3,125 µg/mL. Nessas concentrações observou-se demasiada integridade do tapete celular, sinalizando que não ocorreu morte celular significativa, uma vez que a célula VERO perde aderência quando não viável. Nas Tabelas 1 e 2 verificam-se os dados de concentrações RVC30% e RVC, em seguida, nos gráficos na figura 12 observam-se os dados relativos à análise em escala logarítmica. É importante ressaltar que os dados de viabilidade celular do MTT em células VERO possibilitam a representação do potencial nefrotóxico para as células, onde as moléculas analisadas não tiveram nefrotoxicidade nas concentrações RVC30%, demonstrando uma opção de concentração promissora para aplicações terapêuticas ou funcionais, parecendo não demonstrar potencial de riscos significativos para a saúde renal *in vivo*. O ensaio a ser repetido em outras linhagens de células pode contribuir para representação da toxicidade em outros tipos celulares.

Tabela 1 – Concentrações máximas não tóxicas com até 30% de redução da viabilidade/estado metabólico de respiração celular – MTT

Molécula	Estrutura	RVC30% ( $\mu\text{M/mL}$ )	RVC30% ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ácido clorogênico		0,282	100
Ácido elágico		0,010	3,125
Timol		0,166	25

Fonte: De autoria própria O RVC30% na unidade  $\mu\text{M/mL}$  foi calculado utilizando os seguintes dados estequiométricos: massa molar para ácido clorogênico = 354,31 g/mol; para o ácido elágico = 302,197 g/mol e para o timol = 150,22 g/mol.

A dose representativa de RVC30% do ácido clorogênico encontrado foi de 0,282  $\mu\text{M/mL}$ , sendo então a maior dentre os compostos estudados, mostrando que é necessária uma dose relativamente maior para reduzir a viabilidade em até 30%, concluindo que possui menor potencial citotóxico. Esses dados corroboram com os resultados da curva de análise de viabilidade do ácido clorogênico apresentado por Cariddi e colaboradores (2015), onde, também utilizando células VERO e ensaio de MTT, o ácido clorogênico não afetou negativamente a viabilidade celular, independentemente da concentração testada (de 0 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ) ou ensaio realizado, maiores concentrações promoveram até um pequeno aumento da

viabilidade celular (CARIDDI *et. al*, 2015). Essa constância na alta viabilidade celular do ácido clorogênico também foi observada em pré-tratamento com ácido clorogênico a 0,1  $\mu\text{mol/L}$  e 1  $\mu\text{mol/L}$  no trabalho de Tian e colaboradores (TIAN *at. al*, 2019).

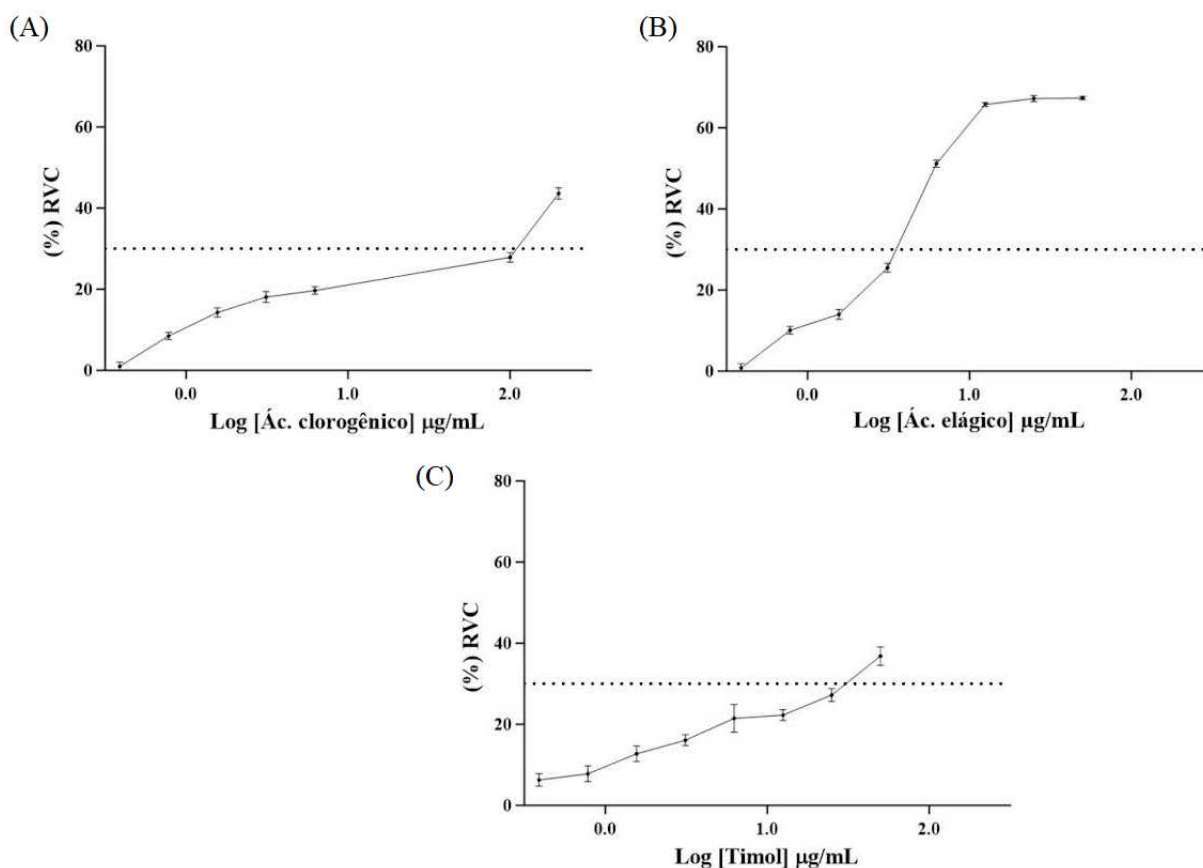
Tabela 2 – Porcentagens de redução da viabilidade celular das moléculas no ensaio de viabilidade celular - MTT

Concentração		Ác. Clorogênico	Ác. Elágico	Timol
200 $\mu\text{g/mL}$	Me	43.63	-	-
	Dp	1.414	-	-
100 $\mu\text{g/mL}$	Me	27.89*	-	-
	Dp	1.226	-	-
50 $\mu\text{g/mL}$	Me	14.19	67.36	36.83
	Dp	0.729	0.398	2.276
25 $\mu\text{g/mL}$	Me	11.19	67.24	27.21*
	Dp	2.079	0.747	1.593
12.5 $\mu\text{g/mL}$	Me	17.71	65.75	22.27
	Dp	1.219	0.455	1.381
6.25 $\mu\text{g/mL}$	Me	19.67	51.15	21.53
	Dp	0.957	0.854	3.424
3.125 $\mu\text{g/mL}$	Me	18.12	25.49*	16.07
	Dp	1.371	1.091	1.369
1.562 $\mu\text{g/mL}$	Me	14.27	14.06	12.74
	Dp	1.193	1.244	1.979
0.781 $\mu\text{g/mL}$	Me	8.51	10.13	7.81
	Dp	0.898	0.978	1.928
0.390 $\mu\text{g/mL}$	Me	1.06	0.83	6.27
	Dp	1.025	1.081	1.543

Fonte: De autoria própria. Tabela indicando as concentrações utilizadas para cada molécula e suas respectivas médias de porcentagem de RVC, bem como o desvio padrão entre as replicatas. O “\*” marca onde foi encontrado o RVC30% em cada uma das amostras. Me: média e Dp: desvio padrão.

Em relação à dose representativa de RVC30% do timol (25 µg/mL), foi observada uma segurança em relação ao uso em células de mamíferos, o que corrobora pelo reconhecimento do timol como uma substância geralmente relatada como segura (“*Generally Recognized as Safe*” - GRAS) pela FDA (21 CFR 182.10, 21 CFR 182.2). Ademais, o timol a 50 µg/mL atingiu 36,83% de RVC, não sendo necessário determinar o ensaio para maiores concentrações diante do objetivo determinado de 30%. No estudo de Sharifi-Rad e colaboradores foi observado que 50% de RVC foi atingido na concentração de 140 µg/mL para o timol comercial Roth (Karlsruhe, Germany). Nesse sentido, para 13,17 % de aumento na RVC seria necessário um aumento de 90 µg/mL na concentração inicial do presente estudo, o qual é um valor considerável, demonstrando uma estabilização na resposta deste composto em relação a viabilidade celular (SHARIFI-RAD *et al.*, 2022).

Figura 12 – Viabilidade celular determinada por MTT na presença de diferentes concentrações de moléculas



Fonte: De autoria própria. Em A - Gráfico do ácido clorogênico, B - Gráfico do ácido elágico e em C - Gráfico do timol, médias de (%) RVC *versus* o logaritmo da concentração de cada molécula em  $\mu\text{g/mL}$ : 200  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , 3.125  $\mu\text{g/mL}$ , 1.562  $\mu\text{g/mL}$ , 0.781  $\mu\text{g/mL}$  e 0.390  $\mu\text{g/mL}$ . Média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

Os resultados de concentração  $\mu\text{g/mL}$  sugeriram que o timol possui um potencial de citotoxicidade de 4 vezes maior que o ácido clorogênico, enquanto que o ácido elágico demonstra um potencial de citotoxicidade em células VERO de 32 vezes ao ácido clorogênico. O ácido elágico apresentou alta citotoxicidade nas maiores concentrações, com redução da viabilidade celular superior a 27% nas concentrações de 12,5 e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Tal resultado demonstra um maior potencial citotóxico em relação a estudos similares, como Muálem e colaboradores, em que avaliaram a citotoxicidade por MTT do ácido elágico em macrófagos peritoneais murinos e notaram uma RVC de 50% na concentração de 23,8  $\mu\text{g/mL}$  de ácido elágico (MUÁLEM *et al.*, 2018), enquanto aqui a RVC de 51.15% foi atingida em 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando que a citotoxicidade é maior nas células VERO do que nos macrófagos.

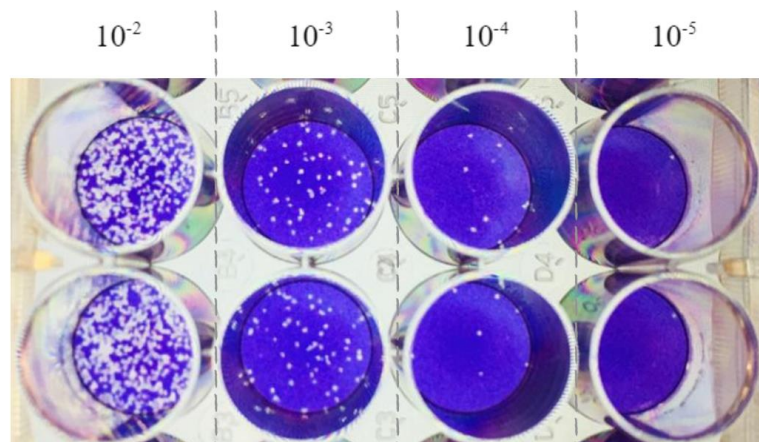
A partir dos gráficos anteriores, observa-se uma tendência a redução da viabilidade celular conforme a concentração das moléculas aumenta, tendo o ácido elágico apresentado o maior potencial citotóxico para a célula VERO (Figura 12). Esses resultados são consistentes com estudos anteriores, reforçando a confiabilidade e destacando as moléculas como uma opção promissora para aplicações terapêuticas ou funcionais. Essa compreensão do RVC é crucial para a avaliação da segurança e eficácia de produtos contendo AC, AE e timol, bem como para o desenvolvimento de futuras pesquisas e aplicações clínicas.

#### 4.2 Titulação viral e determinação da variante

Para se confirmar a variante, o segundo criotubo foi encaminhado para o sequenciamento realizado pelo Grupo de Vigilância Genômica da Fiocruz-CE, no qual foi identificado como sendo da variante Delta AY.99.2, a qual estava predominantemente em circulação no período de coleta. Para outras variantes e cepas houve limitações no isolamento do vírus e consequentes ensaios.

O método utilizado permite quantificar o número de partículas virais viáveis a partir da determinação das Unidades Formadoras de Placa (PFU) em volume de sobrenadante de cultura contendo vírus. Para a titulação viral utilizou-se de diluições 1:10 do vírus estoque. O vírus apresentou uma titulação de  $4,04 \times 10^5$  PFU/mL do SARS-CoV-2. Na figura 13 é possível observar um maior número de placas nas menores diluições, sendo reduzida conforme houve maiores diluições do vírus.

Figura 13 – Teste de PRNT da titulação do SARS-CoV-2



Fonte: De autoria própria. Titulação do vírus SARS-CoV-2 em duplicata nas diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ , respectivamente, da esquerda para a direita.

O título encontrado de  $4,04 \times 10^5$  PFU/mL pode ser associado aos sintomas clínicos do paciente em que a amostra foi coletada, já que títulos elevados de vírus têm sido associados a sintomas clínicos graves resultados (LIBRATY *et al.*, 2002), a avaliação de títulos de vírus infecciosos que refletem melhor a infectividade do vírus é importante para determinar a patogênese da doença, bem como a precisão da capacidade de transmissão. Na detecção da formação de placa, o meio de cobertura (*overlay*) evita fluxos convectivos no meio, permitindo que os vírus se fixem no fundo dos poços e facilite a formação de placas (MATROSOVICH *et al.*, 2006). No trabalho de Fukuta e colaboradores. utilizaram-se outros meios de “*overlay*” para a mesma técnica utilizada, como o meio Avicel e o meio misto de metilcelulose, tais meios se mostraram vantajosos já que cepas clínicas de vírus podem não formar placas claras, mostrando que seria de interesse para ensaios posteriores, a utilização de diferentes meios e sobreposição a fim de resultados melhores (FUKUTA *et al.*, 2021).

Outro ponto a ser ressaltado é que o ensaio de placas para PFU é padrão-ouro para a determinação das concentrações de virions líticos infecciosos, contudo pode ser afetado por vários fatores, incluindo a escolha das células hospedeiras, faixas de diluição, quantidade do meio semi-sólido utilizado para sobreposição e erros na contagem manual (SHURTLEFF *et al.*, 2012). Neste sentido, a utilização clássica do título do vírus PFU teve como resultado a capacidade infecciosa deste vírus e não foi avaliada de forma robusta a quantidade do vírus, já que pode ocorrer uma subestimação dos níveis de partículas infecciosas nessa técnica.

### 4.3 Análise da neutralização viral

As células Vero são conhecidas por serem uma ótima linhagem celular para os ensaios virais (KIESSLICH; KAMEN, 2020), nesse sentido o ensaio para quantificação da neutralização viral foi realizado utilizando as células VERO. Dentre as características relevantes dessa célula para esses ensaios se destaca que a Vero é deficiente na produção de interferon, dificultando a defesa antiviral da linhagem e contribuindo positivamente para a infecção (KIESSLICH; KAMEN, 2020). Outrossim, é a interação da proteína *spike* com a proteína ACE2, que é muito importante para favorecer a entrada do vírus na célula. Tal enzima é expressa, principalmente em células do rim de acordo com o *The Human Protein atlas* (TISSUE EXPRESSION OF ACE2 - SUMMARY, [s. d.]), desse modo, nas células Vero, que são provenientes do rim, pressupõe-se que também ocorrem elevadas quantidades de ACE2 contribuindo para a infecção viral.

Para o formato das células VERO com 24 poços, que abrange o ensaio de infecção viral, é possível ocorrer a entrada viral, síntese de RNA e liberação viral da célula hospedeira, uma vez que as células são expostas ao SARS-CoV-2 por 72h, respeitando a biologia viral durante a infecção do hospedeiro, em que tempo médio estimado para replicação viral em células infectadas varia de cerca de 6 a 12 horas (CHEEMARLA *et. al.*, 2021). Durante o protocolo realizado, houve observação microscópica, onde visualizou-se morte celular, desprendimento do tapete celular e vacuolização do citoplasma onde ocorreram a formação das placas (Figura 13).

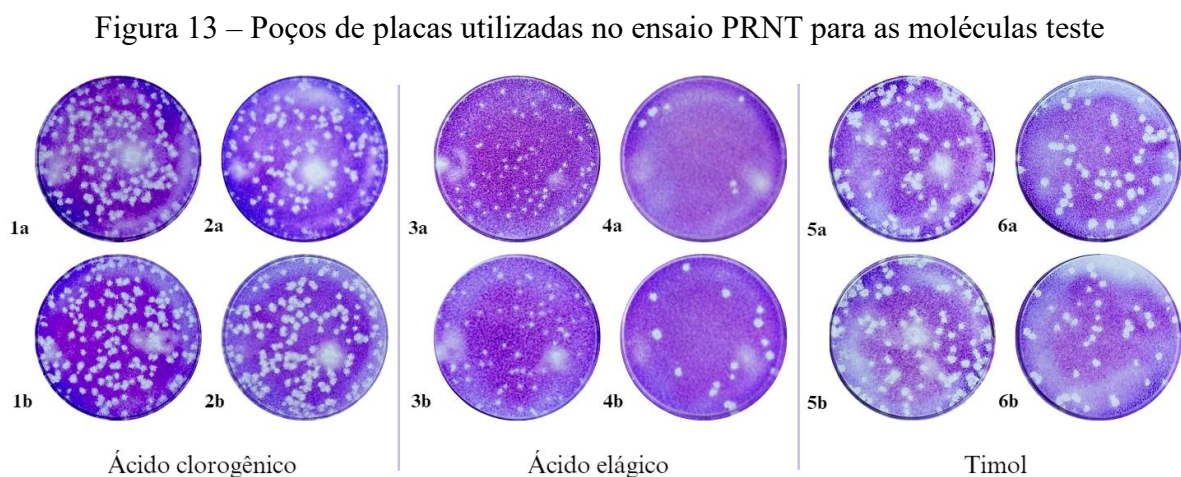
As moléculas foram testadas quanto a sua capacidade de neutralizar o SARS-CoV-2, variante Delta, atuando diretamente no vírus ou indiretamente quando incubadas com as células e posteriormente infectadas. Nenhuma das moléculas diluídas parece ter reduzido a atividade viral do vírus quando incubada com a célula comparado com o nosso controle. Entretanto, quando as amostras foram incubadas diretamente com o vírus e posteriormente nas células, o ácido elágico na concentração de 3.125 µg/mL apresentou atividade inibidora viral de 69,1%.

O achado do ácido elágico diante do vírus SARS-CoV-2 a esta concentração é inédito, mas sua atividade antiviral já havia sido observada como aponta Alexova e colaboradores numa revisão recente, destacando que os elagitaninos hidrolisáveis (constituintes do AE) aparentemente interagem com glicoproteínas virais e moléculas de glicosaminoglicanos em superfície da célula hospedeira, o que auxilia a entrada de uma série de vírus nas células hospedeiras (ALEXOVA *et. al.*, 2023).



O efeito antiviral do AE purificado para outras doenças também têm sido explorado, como contra Zika, HRV-2, HRV-3, HRV-4, em que foi sugerido que o impedimento da gripe pela molécula ocorre pela interrupção da interação do vírus com o superfície da célula hospedeira (ACQUADRO *et. al*, 2020; HAIDARI *et. al*, 2009; PARK *et. al*, 2014). Os efeitos da AE nos vírus podem estender-se a outros mecanismos, a exemplo da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), esta molécula restringe a replicação viral por inibição da integrase viral, mas não da protease (SHIN *et. al*, 2005). Na infecção pelo vírus da hepatite B, por outro lado, o AE restringiu a proliferação viral, do antígeno Be da hepatite (PROMSONG *et. al*, 2018).

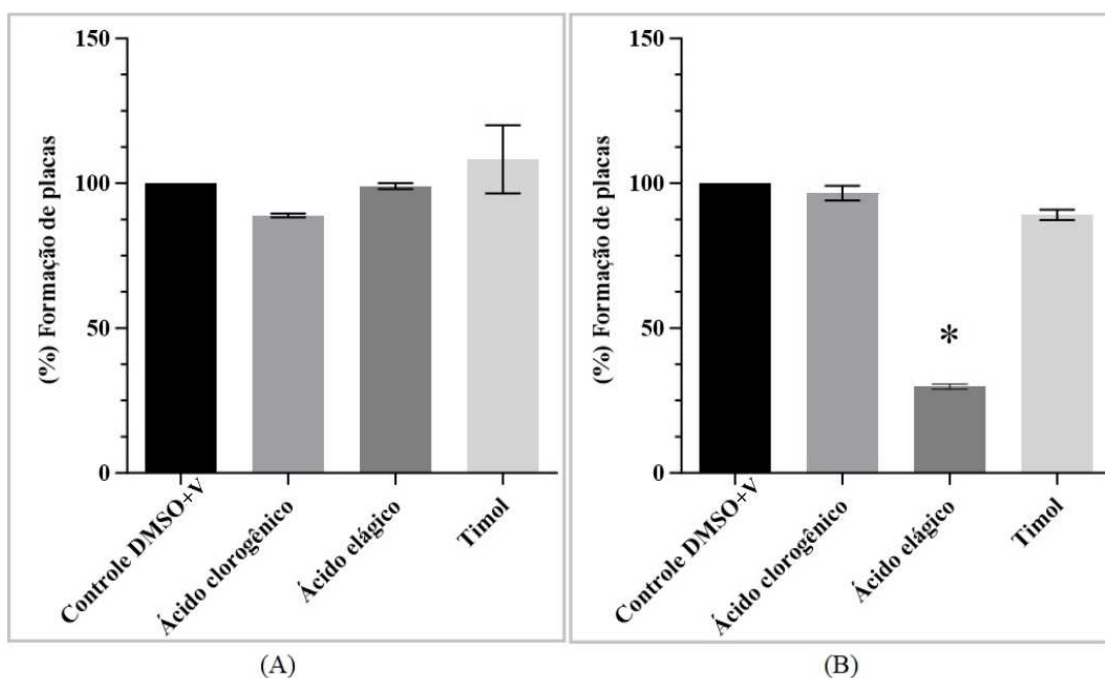
Na figura 14 nota-se uma predominância de placas nos ensaios determinados por molécula+células, enquanto que, para molécula+vírus, observa-se uma redução da formação de placas, sobretudo, para o ácido elágico, o qual, mesmo a baixa concentração (a menor dentre as três moléculas) foi responsável por essa diminuição da atividade viral. É importante ressaltar que nenhum dos compostos fenólicos analisados apresentaram significativa atividade quando foram analisados se atuavam isoladamente nas células. Tal fenômeno mostra, que, provavelmente, a atividade antiviral está relacionada a algum mecanismo de inibição em relação a atividade molécula+vírus (suposto no estudo *in silico* - item 4.4) e não a uma interação prolongada com a molécula.



Fonte: De autoria própria. Imagem representativa de experimentos de diferentes ensaios (n=2). Exemplos dos poços (de diferentes placas) com duplicatas (a e b) dos ensaios de PRNT das moléculas. 1a, 1b, 3a, 3b, 5a e 5b são referentes aos ensaios em que as moléculas primeiramente foram incubadas com as células (molécula+células) e posteriormente infectadas com o vírus. 2a, 2b, 4a, 4b, 6a e 6b são referentes aos ensaios que as moléculas foram primeiramente incubadas com o vírus (molécula+vírus) e posteriormente adicionadas às células. As placas são visualizadas por pontos brancos, que indicam a visualização do fundo da placa e o roxo a integridade da monocamada de células.

Os ensaios parametrizados das moléculas ácido elágico, ácido clorogênico e timol, respectivamente tiveram os seguintes valores de porcentagem de formação de placas em molécula+células: 88,9%, 99% e 100%; para molécula+vírus: 96,7%, 30,9% e 89,1%. A mesma concentração de Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizada para diluir as moléculas previamente foi usada para controle do vírus, objetivando averiguar se não ocorreria interferência na ligação do vírus com a célula, não tendo mostrado interferência, portanto, foi utilizada para representar o valor “100%” da análise.

Figura 14 – Ensaio de PRNT amostra+células e células+vírus



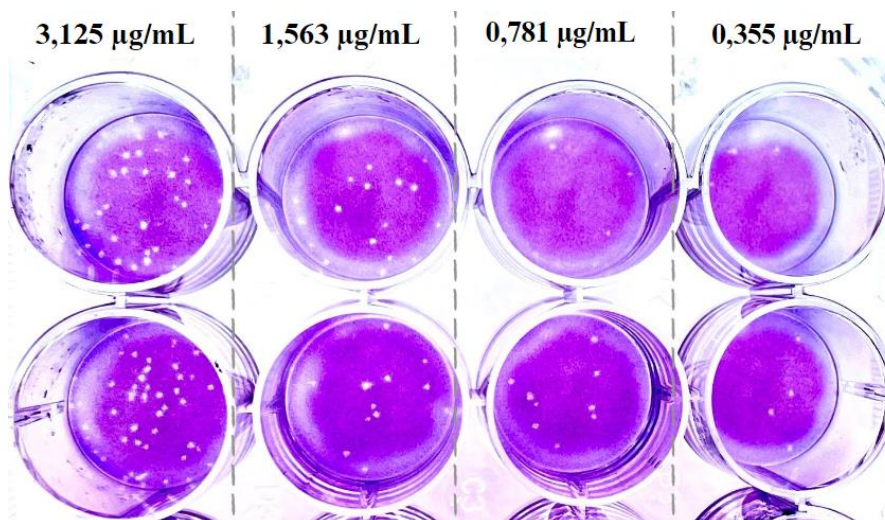
Fonte: De autoria própria. O controle DMSO+Vírus é definido por 100% de formação de placas. Em A - Porcentagem de placas formadas quando as amostras foram inicialmente incubadas com as células e posteriormente infectadas com o vírus. Em B - Porcentagem de placas formadas quando as amostras foram incubadas com o vírus e posteriormente adicionadas às células. Média  $\pm$  desvio padrão (n=2) \* - apresentam diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) pelo teste t.

Das moléculas incubadas com os vírus, apenas uma apresentou atividade neutralizante de forma significativa contra o vírus SARS-CoV-2, quando em contato direto. Dessa forma, o ácido elágico foi diluído de forma seriada e analisado pelo ensaio de PRNT (Figura 15). Foi possível estabelecer o IC50% do ácido elágico, encontrando o valor de 0,3492  $\mu\text{g/mL}$  que corresponde à concentração capaz de diminuir 50% das placas do controle (vírus + DMSO) - Figura 16. O resultado encontrado é divergente do encontrado por David e colaboradores, em que o IC50 do ácido elágico contra o SARS-CoV-2 em ensaios de placa não foi possível ser estabelecido numa curva dose-resposta, pois concentrações na faixa de 1–120

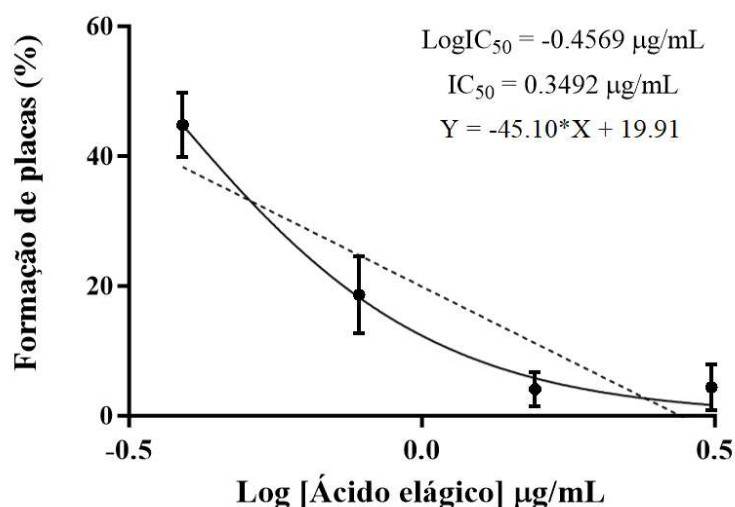
$\mu\text{g/mL}$  desta molécula não inibiram a infecção em células Vero E6 no estudo (DAVID *et. al*, 2021).

Em estudo utilizando extratos da casca de romã, que possui o ácido elágico como segundo principal composto, foram utilizadas maiores concentrações (62.5–1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e o IC50 do extrato foi de 0,06 mg/mL, ou 60  $\mu\text{g/mL}$ , sugerindo uma menor potência do composto em relação à atividade biológica da molécula pura, já que é necessária uma concentração relativamente elevada do extrato (quando comparada com o resultado - 0,3492  $\mu\text{g/mL}$ ) para atingir uma inibição de 50% da atividade biológica alvo (SURUČIĆ *et. al*, 2021). Isso pode indicar que o extrato não é muito eficaz na inibição da atividade viral, mas, quando o extrato está fracionado, a molécula ácido elágico isolada se destaca.

Figura 15 – Ensaio de titulação da molécula ácido elágico



Fonte: De autoria própria. Foram utilizadas diluições seriadas com fator 2 partindo da maior concentração (RVC30% = 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ), com 4 pontos em duplicata, conforme apresentado na figura.

Figura 16 – Estudo do IC<sub>50</sub> do Ácido elágico

Fonte: De autoria própria. O IC<sub>50</sub> foi determinado utilizando a equação dose-resposta – inibidor: log (inibidor) versus normalização da resposta - variável *slope*. Foram utilizadas diluições seriadas com fator 2 partindo da maior concentração (RVC30% = 3,125 µg/mL) em 4 pontos.

Ensaio com células VERO também auxiliaram a determinar a atividade antiviral de outras doenças. Em se tratando de alcalóides, foram observadas inibições do vírus da estomatite vesicular, vírus da doença de Newcastle e vírus da diarreia epidêmica suína em concentrações de 50, 100 e 500 nM em culturas de células, respectivamente (DONG, Hui Jun *et al.*, 2018). Para o vírus CHIKV, extrato de *Uncaria tomentosa* rico em quercetina na concentração de 100 µg/mL reduziu o efeito citopático em cultura (LIMA, 2020). Já para a herpes simples tipo I (HSV-1) foram observados efeitos antivirais principalmente com o uso de polifenóis como a catequina em extratos e amêndoa 0,4 mg/mL (KHAN *et al.*, 2005; SON *et al.*, 2013; HASSAN; MASARČÍKOVÁ; BERCHOVÁ, 2015; MUSARRA-PIZZO *et al.*, 2019).

Para as moléculas testadas neste trabalho outros vírus poderiam ser passíveis de serem testados a exemplo do HSV-1, que já possui validações relatadas sobre o efeito no Timol (LAI *et al.*, 2012; SHARIFI-RAD, J. *et al.*, 2017); de vírus entéricos (KUBIÇA *et al.*, 2014); da dengue (PÁJARO-CASTRO *et al.*, 2015); da febre amarela (GÓMEZ; STASHENKO; OCAZONEZ, 2013) e do zika (HADDAD *et al.*, 2019), tais arboviroses muito relevantes no nosso país. Adicionalmente, é recomendado o teste com outras variantes do SARS-CoV-2, as quais podem impactar a eficácia das moléculas antivirais.

Uma limitação a ser considerada no presente trabalho foi a ausência de um controle de inibição da replicação viral nos ensaios *in vitro* aplicados. Estudos prévios já demonstraram

que durante a cultura de células VERO infectados *in vitro* pelo SARS-CoV-2, o fármaco Remdesivir levou à relativa diminuição da taxa de células infectadas, que foi quantificado pelo RT-PCR quantitativo para detecção do gene SARS-CoV-2, sugerindo o seu uso como controle na inibição da infecção *in vitro* (JANG *et al.*, 2021). No entanto, no nosso modelo, a substância não foi utilizada na análise antiviral nem citotóxica por conta de difícil obtenção medicamentosa.

#### 4.4 Ancoragem molecular

O propósito fundamental de um processo dedicado à descoberta de novos fármacos reside na exploração de moléculas capazes de interagir com os alvos conhecidos associados a doenças específicas, que desencadeiam respostas biológicas. Uma limitação está relacionada à determinação da pontuação de ligação, pois para tal ocorrem várias simplificações na avaliação dos complexos proteína-ligante, não abrangendo completamente todos os fenômenos bioquímicos e físicos. A superfície de energia do complexo proteína-ligante é multidimensional, tornando complexa a identificação de mínimos globais. O sucesso da técnica de ancoragem molecular é avaliado pela capacidade da pose prevista em representar um modelo experimental, com uma discrepância de coordenadas menor que 2 Å. Outros parâmetros críticos incluem a precisão no modo de interação, a capacidade de distinguir moléculas ativas de inativas e a habilidade de classificar moléculas ativas de acordo com medidas experimentais (BALLANTE; MARSHALL, 2016; JAKHAR *et al.*, 2020).

Neste estudo usamos três principais alvos proteicos do SARS-CoV-2 em interação com os três compostos orgânicos. A Tabela 3 mostra a energia total de ligação dos ligantes e alvos moleculares, considerando as características de cada alvo, observamos que a energia total varia de -6.370 Kcal/mol a -7,245 Kcal/mol, principalmente devido às diferentes interações entre o ligante e os alvos potenciais. O ácido clorogênico obteve melhor valor de energia quando avaliado para a proteína S, o ácido elágico obteve maior valor de pontuação para RdRp e o timol obteve triplo modo de ação. O timol se apresenta como a molécula de maior energia de interação para a proteína *Spike*, o que implica numa reprodutibilidade com a “pior” interação, pois o valor menos negativo (na energia livre de Gibbs -  $\Delta G$ ) representa que a formação da ligação é desfavorável em termos de energia. A energia livre  $\Delta G$  é definida como a diferença entre a entropia e a entalpia multiplicada pela temperatura, corresponde a energia que “sobra” após uma interação química, sendo uma reação espontânea somente se a energia livre for menor do que zero. Na ancoragem, o algoritmo vai buscar na interface de ambas as proteínas o local

de ligação com o menor índice de energia livre, assim quanto menor o  $\Delta G$ , teoricamente, mais estável e firmemente ligadas estarão as duas proteínas (GRAY *et. al*, 2003).

Tabela 3 – Ancoragem nos ligantes AC, AE e timol dos alvos moleculares do vírus SARS-Cov-2: RdRp, Spike e MPRO

Moléculas	Pontuação	Energia T.	Energia I.	Energia vdW	Energia E.
<b>RdRp</b>					
Ác. Clorogênico	-6,800	-1,894	-57,090	-1,239	-55,851
Ác. Elágico	-7,004	5,119	-39,054	-9,135	-29,919
Timol	-6,726	14,834	-21,940	-6,936	-15,004
<b>Spike</b>					
Ác. Clorogênico	-7,245	9,590	-42,035	-2,365	-39,670
Ác. Elágico	-6,982	7,230	-41,057	-7,188	-33,869
Timol	-6,869	14,366	-22,510	-8,007	-14,503
<b>M<sup>PRO</sup></b>					
Ác. Clorogênico	-6.464	12.077	-39.954	0.257	-40.211
Ác. Elágico	-6.370	12.505	-32.309	-2.421	-29.888
Timol	-7.037	17.262	-20.283	-4.720	-15.563

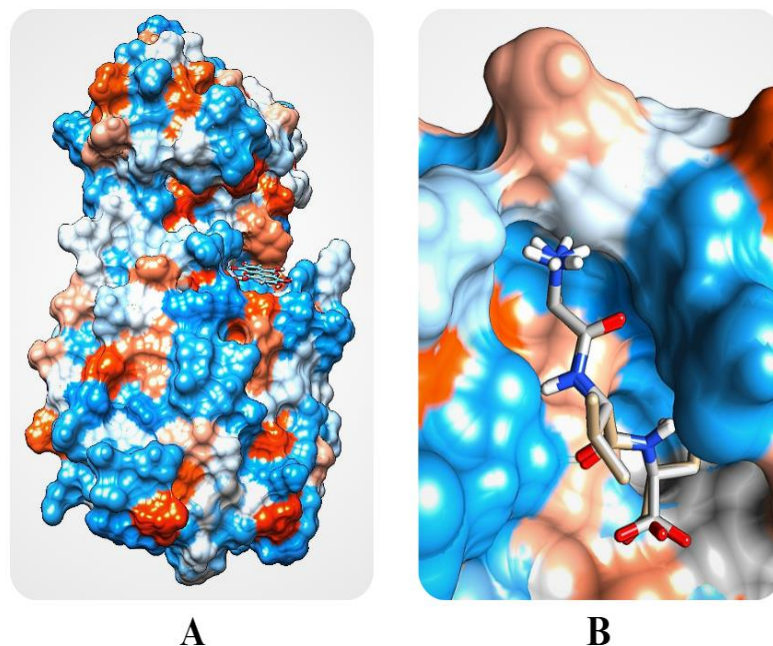
Fonte: De autoria própria. As unidades de energia são dadas em unidades Kcal/mol. T. Energia (energia total), I. Energia (energia de interação), E. vdW ( energia de van der Waals) e E. Energia (energia eletrostática).

O ácido elágico é estudado como um importante agente na prevenção e tratamento de cânceres e patógenos humanos (S) (SELIM *et al.*, 2023). Ele é conhecido por suas atividades antioxidantes, mas demonstra efeitos de resposta imunológica. O ácido elágico pode atuar como um inibidor antiviral, mostrando interação *in silico* contra a proteína RNA polimerase dependente de RNA (Figura 15), que é um fator chave envolvido na síntese de RNA da infecção

viral (WANG *et al.*, 2021). O composto bioativo ácido elágico possui um modo de ligação para SARS-CoV-2 RdRp sendo atribuído à ligação H e a interação com os resíduos Gly808, pro809, His816, Thr817 e Tyr831. Além disso, o sistema de anéis aromáticos do ácido elágico fazem interação hidrofóbica de íon  $\pi$  com Lys798. Assim, o ácido elágico poderia atuar inibindo o processo da replicação, impossibilitando o genoma viral da progênie baseado no modelo de RNA de fita simples de ser sintetizado através da formação de ligações fosfodiéster; isso significa que interromperia um papel indispensável para a COVID-19. Alguns estudos da literatura já haviam confirmado tal hipótese *in silico* (SHALDAM *et al.*, 2021; SUPIAN *et al.*, 2022).

Yang e colaboradores avaliaram o tanino corilagina por meio de ancoragem molecular e em seguida ensaios *in vitro* para validação. Notaram que a corilagina atuou através do bloqueio da fusão do receptor da *Spike* do SARS-CoV-2 com receptores da ACE2 (YANG *et al.*, 2021). Esse estudo corrobora com as possibilidades de ação das moléculas naturais diretamente em ACE2 impedindo a entrada viral na célula (YANG *et al.*, 2021). Selim e colaboradores relata compostos fenólicos do azeite de oliva, em que a Apigenina possui melhor predição de acoplamento contra RdRp, com energia de afinidade de  $-18.2$  kcal/mol, seguido da taxifolina com valor de  $-14.2$  kcal/mol. Ademais, é sugerido a atividade sinérgica onde os compostos brutos no azeite de oliva demonstraram eficácia antiviral moderada contra SARS-CoV-2 *in vitro* (SELIM *et al.*, 2023). A atividade de sinergia usando uma abordagem combinatória entre as moléculas AC, AE e timol também poderia ser observada, sendo uma oportunidade para estudos posteriores.

Figura 17 – Ancoragem molecular do ácido elágico contra a RdRp



Fonte: De autoria própria pelo ChimeraX. Modelo de encaixe 3D da pose mais favorável para a molécula interagindo com a estrutura da enzima - RdRp. Em A observa-se a enzima completa no encaixe e em B uma aproximação do sítio de interação. Representação em branco: carbono, em vermelho: oxigênio, em azul: nitrogênio (hidrogênios não aparecem).

Nesse contexto, os compostos fenólicos, notáveis antioxidantes dietéticos, têm sido amplamente reconhecidos, e os ácidos clorogênicos, em particular, têm recebido atenção devido à sua distribuição abrangente e à sua presença na dieta humana, com potenciais efeitos biológicos (UPADHYAY; MOHAN RAO, 2013). Esses ácidos demonstram uma variedade de atividades farmacológicas, como exemplificado por um estudo que destacou a capacidade de flavonoides como potenciais inibidores da entrada do SARS-CoV-2. Utilizando triagem virtual baseada em ancoragem molecular e um subsequente ensaio com pseudovírus, o ácido isoclorogênico, proveniente de uma biblioteca de 1871 compostos naturais da *Push Biotechnology* (Chengdu, China), revelou-se um antiviral eficaz da entrada de pseudovírus, alcançando concentrações de até 100  $\mu\text{M}$ . Este efeito sugeriu uma possível interação molecular com a RdRp, o mesmo mecanismo do Remdesivir, proporcionando uma perspectiva promissora para a exploração desses compostos na busca por estratégias terapêuticas contra a infecção por SARS-CoV-2. (ZHANG *et al.*, 2021).

Os componentes principais de vários óleos essenciais, reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, foram acoplados ao domínio de ligação ao receptor S1 da glicoproteína spike (S) - RBD. Ao examinar o timol em relação à proteína S, dados revelaram



uma interação altamente eficaz, demonstrando uma das melhores pontuações entre todos os compostos, de - 5.4 kcal/mol para a RBD da Spike. O estudo destaca que a presença do anel de fenol, juntamente com a adição do grupo hidroxila, confere a esses compostos uma eficiência notável como agentes antivirais (KULKARNI *et al.*, 2020); Tal resultado não ratifica o descrito (Tabela 3), uma vez que teve-se as outras moléculas com pontuação melhor que o timol, então se sugere uma abordagem de interação mais específica do Timol, na região S1 da proteína.

Acerca das limitações ressalta-se que o *software in silico* depende de suposições e simplificações que podem não refletir com precisão a complexidade biológica dos sistemas. Por exemplo, as proteínas podem ser modeladas como uma estrutura rígida em vez de flexível e com moléculas dinâmicas, ou a afinidade do ligante para as proteínas é assumida com base em dados empíricos, conhecidos como campos de força. Embora os estudos *in silico* forneçam informações valiosas sobre o potencial dos antivirais, é importante validar as previsões feitas por modelos *in silico* utilizando estudos *in vitro* e *in vivo*. Embora estudos *in vitro* tenham comprovado ser útil na seleção de antivirais, é importante reconhecer sua limitação em imitar o ambiente fisiológico. Um exemplo que demonstra essa limitação é a cloroquina, que possui um resultado extremamente favorável *in silico* e atualmente existem diversas evidências mostram resultados ineficientes clinicamente (HO *et. al*, 2021).

## 5 CONCLUSÃO

O estudo desempenhou um papel significativo na identificação e avaliação de moléculas com potencial para inibir o SARS-CoV-2. Foi obtido o conjunto de moléculas anti-SARS-CoV-2 a partir de uma biblioteca química composta por um Banco virtual de moléculas da Embrapa Agroindústria Tropical. A determinação da atividade citotóxica *in vitro* para as moléculas ácido clorogênico, ácido elágico e timol ocorreu. A partir da atividade que reduz a viabilidade e estado metabólico celular em até 30% ocorreu a análise da neutralização viral das amostras, que revelou variações nos níveis de atividade, destacando-se o ácido elágico com taxa de inibição de 69,1% contra a variante Delta do vírus, logo determinou-se sua IC50. Embora os compostos fenólicos timol e ácido clorogênico não tenham demonstrado atividade antiviral significativa, a interação proeminente do ácido elágico com a RdRp, evidenciada nos ensaios de ancoragem molecular contra as proteínas-chave, fortalece sua posição como um possível agente terapêutico.

Tal agente pode ser utilizado na suplementação beneficiando indivíduos com alto risco de complicações graves de COVID-19, como idosos, pacientes com diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, aterosclerose e doenças neurodegenerativas; e beneficiando também países com restrições financeiras e de infraestrutura de saúde. No entanto, é importante ressaltar que esses resultados são preliminares e requerem validação por meio de estudos adicionais. Trabalhos futuros devem avaliar cuidadosamente a biodisponibilidade, dosagem adequada, modo de entrega e potencial combinatório de produtos naturais em modelos *in vivo* antes de serem testados em ensaios clínicos em humanos. Além disso, é crucial melhorar a eficácia e capacidade de entrega de medicamentos antivirais, como o desenvolvimento de antivirais em aerossol para administração por inalação e sistemas de entrega de nano-transportadores para melhorar a biodisponibilidade. Esses esforços contribuem para o acervo de conhecimento sobre moléculas com atividades antivirais e fornecem compreensão mais profunda para o desenvolvimento de estratégias alternativas no controle do SARS-CoV-2.

## REFERÊNCIAS

- ABBASIAN, M. H.; MAHMANZAR, M.; RAHIMIAN, K.; *et al.* Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, n. 1, p. 152, 2023. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-023-03996-w>. Acesso em: janeiro 2024.
- ACQUADRO, S.; CIVRA, A.; CAGLIERO, C.; *et al.* Punica granatum Leaf Ethanolic Extract and Ellagic Acid as Inhibitors of Zika Virus Infection. **Planta Medica**, v. 86, n. 18, p. 1363–1374, 2020. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1232-5705>.
- ADAMSON, C. S.; CHIBALE, K.; GOSS, R. J. M.; JASPARS, M.; NEWMAN, D. J.; DORRINGTON, R. A. Correction: Antiviral drug discovery: preparing for the next pandemic. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 50, n° 16, p. 9346, 2021. DOI 10.1039/D1CS90064A. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/D1CS90064A>. Acesso em: 9 jan. 2024.
- AHMED-BELKACEM, A.; GUICHOU, J. F.; BRILLET, R.; AHNOU, N.; HERNANDEZ, E.; PALLIER, C.; PAWLITSKY, J. M. Inhibition of RNA binding to hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: a new mechanism for antiviral intervention. **Nucleic acids research**, vol. 42, n° 14, p. 9399–9409, 18 ago. 2014. DOI 10.1093/NAR/GKU632. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25053847/>. Acesso em: 9 jan. 2024.
- AJILA, C. M.; BHAT, S. G.; PRASADA RAO, U. J. S. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. **Food Chemistry**, vol. 102, n° 4, p. 1006–1011, 1 jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.06.036>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- ALEXOVA, R.; ALEXANDROVA, S.; DRAGOMANOVA, S.; *et al.* Anti-COVID-19 Potential of Ellagic Acid and Polyphenols of Punica granatum L. **Molecules**, v. 28, n. 9, p. 3772, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/9/3772>.
- ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.
- ANDERSEN, K. G.; RAMBAUT, A.; LIPKIN, W. I.; HOLMES, E. C.; GARRY, R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature Medicine**, vol. 26, n° 4, p. 450–452, 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0820-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
- AUGUSTI, P. R.; CONTERATO, G. M. M.; DENARDIN, C. C.; PRAZERES, I. D.; SERRA, A. T.; BRONZE, M. R.; EMANUELLI, T. Bioactivity, bioavailability, and gut microbiota transformations of dietary phenolic compounds: implications for COVID-19. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, vol. 97, p. 108787, 1 nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2021.108787>. Acesso em: 25 dez. 2023.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. de L. D.; SILVA, F. M. da; RESSEL, L. B. Medicinal plants: the knowledge sustained by daily life practice. **Escola Anna Nery**, vol. 15, nº 1, p. 132–139, mar. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1414-81452011000100019>.

BAGGIERI, M.; GIOACCHINI, S.; BORGONOVO, G.; CATINELLA, G.; MARCHI, A.; PICONE, P.; VASTO, S.; FIORAVANTI, R.; BUCCI, P.; KOJOURI, M.; GIUSEPPETTI, R.; D'UGO, E.; UBALDI, F.; DALLAVALLE, S.; NUZZO, D.; PINTO, A.; MAGURANO, F. Antiviral, virucidal and antioxidant properties of *Artemisia annua* against SARS-CoV-2. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, vol. 168, p. 115682, 1 dez. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115682>. Acesso em: 8 jan. 2024.

BALLANTE, F.; MARSHALL, G. R. An Automated Strategy for Binding-Pose Selection and Docking Assessment in Structure-Based Drug Design. **Journal of Chemical Information and Modeling**, vol. 56, nº 1, p. 54–72, 25 jan. 2016. DOI 10.1021/ACS.JCIM.5B00603/SUPPL\_FILE/CI5B00603\_SI\_001.PDF. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.5b00603>. Acesso em: 9 jan. 2024.

BALU, M.; SANGEETHA, P.; HARIPRIYA, D.; PANNEERSELVAM, C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. **Neuroscience letters**, vol. 383, nº 3, p. 295–300, 5 ago. 2005. DOI 10.1016/J.NEULET.2005.04.042. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15955424/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

BARVE, A.; CHEN, C.; HEBBAR, V.; DESIDERIO, J.; SAW, C. L. L.; KONG, A. N. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. **Biopharmaceutics & drug disposition**, vol. 30, nº 7, p. 356–365, 2009. DOI 10.1002/BDD.677. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19722166/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

BEIGEL, J. H.; TOMASHEK, K. M.; DODD, L. E.; MEHTA, A. K.; ZINGMAN, B. S.; KALIL, A. C.; HOHMANN, E.; CHU, H. Y.; LUETKEMEYER, A.; KLINE, S.; LOPEZ DE CASTILLA, D.; FINBERG, R. W.; DIERBERG, K.; TAPSON, V.; HSIEH, L.; PATTERSON, T. F.; PAREDES, R.; SWEENEY, D. A.; SHORT, W. R.; ... LANE, H. C. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. **New England Journal of Medicine**, vol. 383, nº 19, p. 1813–1826, 22 maio 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2007764. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2007764>.

BERNAUER, U.; OBEREMM, A.; MADIE, S.; GUNDERT-REMY, U. The Use of in vitro Data in Risk Assessment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, vol. 96, nº 3, p. 176–181, 1 mar. 2005. DOI 10.1111/J.1742-7843.2005.PTO960306.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-7843.2005.pto960306.x>. Acesso em: 7 jan. 2024.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, vol. 4, p. 14–19, 1996. Disponível em: <https://www.scinapse.io/papers/2439044246>. Acesso em: 7 jan. 2024.

BEWLEY, K. R.; COOMBES, N. S.; GAGNON, L.; MCINROY, L.; BAKER, N.; SHAIK, I.; ST-JEAN, J. R.; ST-AMANT, N.; BUTTIGIEG, K. R.; HUMPHRIES, H. E.; GODWIN, K. J.; BRUNT, E.; ALLEN, L.; LEUNG, S.; BROWN, P. J.; PENN, E. J.; THOMAS, K.; KULNIS, G.; HALLIS, B.; ... CHARLTON, S. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. **Nature Protocols** 2021 **16:6**, vol. 16, nº 6, p. 3114–3140, 23 abr. 2021. DOI 10.1038/s41596-021-00536-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41596-021-00536-y>. Acesso em: 6 jan. 2024.

BHARADWAJ, S.; EL-KAFRAWY, S. A.; ALANDIJANY, T. A.; BAJRAI, L. H.; SHAH, A. A.; DUBEY, A.; SAHOO, A. K.; YADAVA, U.; KAMAL, M. A.; AZHAR, E. I.; KANG, S. G.; DWIVEDI, V. D. Structure-Based Identification of Natural Products as SARS-CoV-2 Mpro Antagonist from *Echinacea angustifolia* Using Computational Approaches. **Viruses**, vol. 13, nº 2, 1 fev. 2021. DOI 10.3390/V13020305. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33672054/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

BLANCK, S.; ZIEBUHR, J. Proteolytic processing of mesonivirus replicase polyproteins by the viral 3C-like protease. **The Journal of general virology**, vol. 97, nº 6, p. 1439–1445, 1 jun. 2016. DOI 10.1099/JGV.0.000458. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26977900/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

BOBROWSKI, T.; MELO-FILHO, C. C.; KORN, D.; ALVES, V. M.; POPOV, K. I.; AUERBACH, S.; SCHMITT, C.; MOORMAN, N. J.; MURATOV, E. N.; TROPSHA, A. Learning from history: do not flatten the curve of antiviral research! **Drug Discovery Today**, vol. 25, nº 9, p. 1604–1613, 1 set. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2020.07.008>. Acesso em: 27 nov. 2023.

BORODUSKE, A.; JEKABSONS, K.; RIEKSTINA, U.; MUCENIECE, R.; ROSTOKS, N.; NAKURTE, I. Wild *Sambucus nigra* L. from north-east edge of the species range: A valuable germplasm with inhibitory capacity against SARS-CoV2 S-protein RBD and hACE2 binding in vitro. **Industrial Crops and Products**, vol. 165, p. 113438, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113438>. Acesso em: 8 jan. 2024.

BRYANT, A.; LAWRIE, T. A.; DOWSWELL, T.; FORDHAM, E. J.; MITCHELL, S.; HILL, S. R.; THAM, T. C. Ivermectin for Prevention and Treatment of COVID-19 Infection: A Systematic Review, Meta-analysis, and Trial Sequential Analysis to Inform Clinical Guidelines. **American Journal of Therapeutics**, vol. 28, p. 434–460, 2021. Disponível em: <https://www.gofundme>.

CARABELLI, A. M.; PEACOCK, T. P.; THORNE, L. G.; HARVEY, W. T.; HUGHES, J.; DE SILVA, T. I.; PEACOCK, S. J.; BARCLAY, W. S.; DE SILVA, T. I.; TOWERS, G. J.; ROBERTSON, D. L. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. **Nature Reviews Microbiology** 2023 **21:3**, vol. 21, nº 3, p. 162–177, 18 jan. 2023. DOI 10.1038/s41579-022-00841-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00841-7>. Acesso em: 24 dez. 2023.

CARIDDI, L. N.; SABINI, M. C.; ESCOBAR, F. M.; MONTIRONI, I.; MAÑAS, F.; IGLESIAS, D.; COMINI, L. R.; SABINI, L. I.; DALCERO, A. M. Polyphenols as possible bioprotectors against cytotoxicity and DNA damage induced by ochratoxin A.

**Environmental toxicology and pharmacology**, vol. 39, nº 3, p. 1008–1018, 1 maio 2015.

DOI 10.1016/J.ETAP.2015.03.013. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25867686/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

CAVALCANTI, A. B.; ZAMPIERI, F. G.; ROSA, R. G.; AZEVEDO, L. C. P.; VEIGA, V. C.; AVEZUM, A.; DAMIANI, L. P.; MARCADENTI, A.; KAWANO-DOURADO, L.; LISBOA, T.; JUNQUEIRA, D. L. M.; DE BARROS E SILVA, P. G. M.; TRAMUJAS, L.; ABREU-SILVA, E. O.; LARANJEIRA, L. N.; SOARES, A. T.; ECHENIQUE, L. S.; PEREIRA, A. J.; FREITAS, F. G. R.; BERWANGER, O. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. **New England Journal of Medicine**, vol. 383, nº 21, p. 2041–2052, 23 jul. 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2019014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2019014>.

CDC. Coronavirus (COVID-19): symptoms of coronavirus. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>. Acesso em: 14 fev. 2024.

CHAKRAVARTI, R.; SINGH, R.; GHOSH, A.; DEY, D.; SHARMA, P.; VELAYUTHAM, R.; ROY, S.; GHOSH, D. A review on potential of natural products in the management of COVID-19. **RSC Advances**, vol. 11, nº 27, p. 16711–16735, 30 abr. 2021. DOI 10.1039/D1RA00644D. Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/ra/d1ra00644d>. Acesso em: 25 dez. 2023.

CHAN, J. F. W.; YUAN, S.; KOK, K. H.; TO, K. K. W.; CHU, H.; YANG, J.; XING, F.; LIU, J.; YIP, C. C. Y.; POON, R. W. S.; TSOI, H. W.; LO, S. K. F.; CHAN, K. H.; POON, V. K. M.; CHAN, W. M.; IP, J. D.; CAI, J. P.; CHENG, V. C. C.; CHEN, H.; ... YUEN, K. Y. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet**, vol. 395, nº 10223, p. 514–523, 15 fev. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9).

CHEEMARLA, N. R.; WATKINS, T. A.; MIHAYLOVA, V. T.; *et al.* Magnitude and timing of the antiviral response determine SARS-CoV-2 replication early in infection. preprint, Infectious Diseases (except HIV/AIDS), 2021. Disponível em:

<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.01.22.21249812v2>.

CHEN, Z.; AZMAN, A. S.; CHEN, X.; ZOU, J.; TIAN, Y.; SUN, R.; XU, X.; WU, Y.; LU, W.; GE, S.; ZHAO, Z.; YANG, J.; LEUNG, D. T.; DOMMAN, D. B.; YU, H. Global landscape of SARS-CoV-2 genomic surveillance and data sharing. **Nature Genetics**, vol. 54, nº 4, p. 499–507, 2022. DOI 10.1038/s41588-022-01033-y. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/s41588-022-01033-y>.

CHENG, V. C. C.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; YUEN, K. Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus as an Agent of Emerging and Reemerging Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 20, n° 4, p. 660–694, 2007. DOI 10.1128/cmr.00023-07. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/cmr.00023-07>.

CHIUW, K. H.; PHOON, M. C.; PUTTI, T.; TAN, B. K. H.; CHOW, V. T. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, vol. 9, n° 1, p. 1–7, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.APJTM.2015.12.002>. Acesso em: 8 jan. 2024.

CORONAVÍRUS BRASIL. [2024]. **Painel Coronavírus** - Síntese de casos, óbitos, incidência e mortalidade. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em: 14 fev. 2024.

CORTEGIANI, A.; INGOGLIA, G.; IPPOLITO, M.; GIARRATANO, A.; EINAIV, S. A systematic review on the efficacy and safety of chloroquine for the treatment of COVID-19. **Journal of Critical Care**, vol. 57, p. 279–283, 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.03.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883944120303907>.

COVID - CORONAVIRUS STATISTICS - **Worldmeter**. [2024]. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/>. Acesso em: 14 fev. 2024.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules** **2010**, Vol. 15, Pages 7313-7352, vol. 15, n° 10, p. 7313–7352, 21 out. 2010. DOI 10.3390/MOLECULES15107313. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313/htm>. Acesso em: 25 dez. 2023.

DAVID, A. B.; DIAMANT, E.; DOR, E.; *et al.* Identification of SARS-CoV-2 Receptor Binding Inhibitors by In Vitro Screening of Drug Libraries. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3213, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/11/3213>. Acesso em: 25 dez. 2023.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, vol. 34, n° 6, p. 1051–1056, 2011. DOI 10.1590/S0100-40422011000600023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/YXMrPRJQT6kYdkv7NQThdDb/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

DERKSEN, A.; KÜHN, J.; HAFEZI, W.; SENDKER, J.; EHRHARDT, C.; LUDWIG, S.; HENSEL, A. Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A virus. **Journal of ethnopharmacology**, vol. 188, p. 144–152, 21 jul. 2016. DOI 10.1016/J.JEP.2016.05.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27178637/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

DIAZ, J. H. Hypothesis: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers may increase the risk of severe COVID-19. **Journal of Travel Medicine**, vol. 27, n° 3, 2021. <https://doi.org/10.1093/JTM/TAAA041>.

DONG, H. J.; WANG, Z. H.; MENG, W.; LI, C. C.; HU, Y. X.; ZHOU, L.; WANG, X. J. The Natural Compound Homoharringtonine Presents Broad Antiviral Activity In Vitro and In Vivo. **Viruses** 2018, Vol. 10, Page 601, vol. 10, n° 11, p. 601, 1 nov. 2018. DOI 10.3390/V10110601. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/10/11/601/htm>. Acesso em: 8 jan. 2024.

DONG, S.; SUN, J.; MAO, Z.; WANG, L.; LU, Y. L.; LI, J. A guideline for homology modeling of the proteins from newly discovered betacoronavirus, 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Journal of medical virology**, vol. 92, n° 9, p. 1542–1548, 1 set. 2020. DOI 10.1002/JMV.25768. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32181901/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

DUAN, J.; ZHAN, J.; WANG, G.; *et al.* The red wine component ellagic acid induces autophagy and exhibits anti-lung cancer activity in vitro and in vivo. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 1, p. 143–154, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.13899>. Acesso em: 25 dez. 2023.

DUBÉ, E.; MACDONALD, N. E. COVID-19 vaccine hesitancy. **Nature Reviews Nephrology** 2022 18:7, vol. 18, n° 7, p. 409–410, 12 abr. 2022. DOI 10.1038/s41581-022-00571-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41581-022-00571-2>. Acesso em: 8 jan. 2024.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 40, n° 2–3, p. 193–236, 2002. DOI 10.1016/S0278-6915(01)00118-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11893398/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avançados**, v. 34, n. 100, p. 7–27, 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-40142020000300007&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142020000300007&tlng=pt)

FILIZOLA, B. de C.; SAMPAIO, M. Bonesso. **Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas**. Brasília: Sociedade, População e Natureza, 2015.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, vol. 160, n° 2, p. 171–177, 5 jan. 2006. DOI 10.1016/J.TOXLET.2005.07.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111842/>. Acesso em: 7 jan. 2024.



FUKUTA, M.; NGUYEN, C. T.; NGUYEN, T. T. T.; *et al.* Discrepancies in Infectivity of Flavivirus and SARS-CoV-2 Clinical Samples: An Improved Assay for Infectious Virus Shedding and Viremia Assessment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 18, p. 9845, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/18/18/9845>. Acesso em: 7 jan. 2024.

GANESAN, K.; XU, B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. **Nutrients**, vol. 9, n° 5, 1 maio 2017. DOI 10.3390/NU9050455. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28471393/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

GAO, S.; WANG, Y.; YU, S.; HUANG, Y.; LIU, H.; CHEN, W.; HE, X. Effects of drought stress on growth, physiology and secondary metabolites of Two Adonis species in Northeast China. **Scientia Horticulturae**, vol. 259, p. 108795, 3 jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.108795>. Acesso em: 25 dez. 2023.

GAUTRET, P.; LAGIER, J. C.; PAROLA, P.; HOANG, V. T.; MEDDEB, L.; MAILHE, M.; DOUDIER, B.; COURJON, J.; GIORDANENGO, V.; VIEIRA, V. E.; TISSOT DUPONT, H.; HONORÉ, S.; COLSON, P.; CHABRIÈRE, E.; LA SCOLA, B.; ROLAIN, J. M.; BROUQUI, P.; RAOULT, D. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 56, n° 1, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105949>.

GÓMEZ, L. A.; STASHENKO, E.; OCAZIONEZ, R. E. Comparative Study on In Vitro Activities of Citral, Limonene and Essential Oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on Yellow Fever Virus. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800230>, vol. 8, n° 2, p. 249–252, 1 fev. 2013. DOI 10.1177/1934578X1300800230. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1300800230>. Acesso em: 9 jan. 2024.

GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L.; ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E. J. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. **Virus Research**, vol. 117, n° 1, p. 17–37, 1 abr. 2006. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2006.01.017>. Acesso em: 24 dez. 2023.

GORDON, D. E.; JANG, G. M.; BOUHADDOU, M.; XU, J.; OBERNIER, K.; WHITE, K. M.; O'MEARA, M. J.; REZELJ, V. V.; GUO, J. Z.; SWANEY, D. L.; TUMMINO, T. A.; HÜTTENHAIN, R.; KAAKE, R. M.; RICHARDS, A. L.; TUTUNCUOGLU, B.; FOUSSARD, H.; BATRA, J.; HAAS, K.; MODAK, M.; ... KROGAN, N. J. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, vol. 583, n° 7816, p. 459–468, 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2286-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>.

GRAY, J. J.; MOUGHON, S.; WANG, C.; *et al.* Protein–Protein Docking with Simultaneous Optimization of Rigid-body Displacement and Side-chain Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 331, n. 1, p. 281–299, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283603006703>.

GUAN, W.; NI, Z.; HU, Y.; LIANG, W.; OU, C.; HE, J.; LIU, L.; SHAN, H.; LEI, C.; HUI, D. S. C.; DU, B.; LI, L.; ZENG, G.; YUEN, K.-Y.; CHEN, R.; TANG, C.; WANG, T.; CHEN, P.; XIANG, J.; ... ZHONG, N. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, vol. 382, n° 18, p. 1708–1720, 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2002032. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>.

GUEDES, I. A.; BARRETO, A. M. S.; MARINHO, D.; KREMPSE, E.; KUENEMANN, M. A.; SPERANDIO, O.; DARDENNE, L. E.; MITEVA, M. A. New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery. **Scientific Reports** 2021 11:1, vol. 11, n° 1, p. 1–19, 4 fev. 2021. DOI 10.1038/s41598-021-82410-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-82410-1>. Acesso em: 9 jan. 2024.

HADDAD, J. G.; PICARD, M.; BÉNARD, S.; DESVIGNES, C.; DESPRÈS, P.; DIOTEL, N.; EL KALAMOUNI, C. Ayapana triplinervis Essential Oil and Its Main Component Thymohydroquinone Dimethyl Ether Inhibit Zika Virus at Doses Devoid of Toxicity in Zebrafish. **Molecules (Basel, Switzerland)**, vol. 24, n° 19, 23 set. 2019. DOI 10.3390/MOLECULES24193447. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31547527/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

HADARI, M.; ALI, M.; WARD CASSCELLS, S.; MADJID, M. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1127–1136, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711309001652>.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M. L. C.; LELY, A. T.; NAVIS, G. J.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of pathology**, vol. 203, n° 2, p. 631–637, jun. 2004. DOI 10.1002/PATH.1570. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15141377/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

HAN, W.; QUAN, B.; GUO, Y.; ZHANG, J.; LU, Y.; FENG, G.; WU, Q.; FANG, F.; CHENG, L.; JIAO, N.; LI, X.; CHEN, Q. The course of clinical diagnosis and treatment of a case infected with coronavirus disease 2019. **Journal of Medical Virology**, vol. 92, n° 5, p. 461–463, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.25711>.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery** 2015 14:2, vol. 14, n° 2, p. 111–129, 23 jan. 2015. DOI 10.1038/nrd4510. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd4510>. Acesso em: 25 dez. 2023.

HASHEMIPOUR, H.; KERMANSHAHI, H.; GOLIAN, A.; VELDKAMP, T. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2059–2069, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003257911938808X>. Acesso em: 9 jan. 2024.

HASSAN, S. T. S.; MASARČÍKOVÁ, R.; BERCHOVÁ, K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, vol. 67, n° 10, p. 1325–1336, 1 out. 2015. DOI 10.1111/JPHP.12436. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26060043/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

HOLSHUE, M. L.; DEBOLT, C.; LINDQUIST, S.; LOFY, K. H.; WIESMAN, J.; BRUCE, H.; SPITTERS, C.; ERICSON, K.; WILKERSON, S.; TURAL, A.; DIAZ, G.; COHN, A.; FOX, L.; PATEL, A.; GERBER, S. I.; KIM, L.; TONG, S.; LU, X.; LINDSTROM, S.; ... PILLAI, S. K. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. **New England Journal of Medicine**, vol. 382, n° 10, p. 929–936, 2020. DOI 10.1056/NEJMoa2001191. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>.

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

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, vol. 395, n° 10223, p. 497–506, 15 fev. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).

HUANG, S.; WANG, L.; XUE, N. *et al.* Chlorogenic acid effectively treats cancers through induction of cancer cell differentiation. *Theranostics*, v. 9, n. 23, p. 6745–6763, 2019. Disponível em: <http://www.thno.org/v09p6745.htm>. Acesso em: 4 fev. 2024.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) | CURRENT ICTV TAXONOMY RELEASE. [s. d.]. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae>. Acesso em: 24 dez. 2023.

JAKHAR, R.; DANGI, M.; KHICHI, A.; CHHILLAR, A. K. Relevance of Molecular Docking Studies in Drug Designing. **Current Bioinformatics**, vol. 15, n° 4, p. 270–278, 19 dez. 2019. <https://doi.org/10.2174/1574893615666191219094216>. Acesso em: 9 jan. 2024.

JAMWAL, K.; BHATTACHARYA, S.; PURI, S. Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, vol. 9, p. 26–38, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2017.12.003>. Acesso em: 25 dez. 2023.

JANG, Y.; SHIN, J. S.; LEE, M. K.; JUNG, E.; AN, T.; KIM, U. II; KIM, K.; KIM, M. Comparison of Antiviral Activity of Gemcitabine with 2'-Fluoro-2'-Deoxycytidine and Combination Therapy with Remdesivir against SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 1581**, vol. 22, n° 4, p. 1581, 4 fev. 2021a. DOI 10.3390/IJMS22041581. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1581/htm>. Acesso em: 9 jan. 2024.

JANG, Y.; SHIN, J. S.; LEE, M. K.; JUNG, E.; AN, T.; KIM, U. Il; KIM, K.; KIM, M. Comparison of Antiviral Activity of Gemcitabine with 2'-Fluoro-2'-Deoxycytidine and Combination Therapy with Remdesivir against SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences** **2021**, Vol. **22**, Page **1581**, vol. 22, n° 4, p. 1581, 4 fev. 2021b. DOI 10.3390/IJMS22041581. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/4/1581/htm>. Acesso em: 9 jan. 2024.

JIMÉNEZ-GARCÍA, B.; ROEL-TOURIS, J.; ROMERO-DURANA, M.; VIDAL, M.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, D.; FERNÁNDEZ-RECIO, J. LightDock: a new multi-scale approach to protein–protein docking. **Bioinformatics**, vol. 34, n° 1, p. 49–55, 1 jan. 2018. DOI 10.1093/BIOINFORMATICS/BTX555. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx555>. Acesso em: 9 jan. 2024.

KANG, I.; BUCKNER, T.; SHAY, N. F.; GU, L.; CHUNG, S. Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. **Advances in Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 961–972, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2161831322007827>. Acesso em: 9 jan. 2024.

KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral research**, vol. 67, n° 2, p. 107–119, 2005. DOI 10.1016/J.ANTIVIRAL.2005.05.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16040137/>. Acesso em: 8 jan. 2024.

KHAN, S. A. ; KHAN, A. ; ZIA, K. ; SHAWISH, I. ; BARAKAT, A. ; KHAN, S. A.; KHAN, A.; ZIA, K.; SHAWISH, I.; BARAKAT, A.; UL-HAQ, Z. Cheminformatics-Based Discovery of Potential Chemical Probe Inhibitors of Omicron Spike Protein. **International Journal of Molecular Sciences** **2022**, Vol. **23**, Page **10315**, vol. 23, n° 18, p. 10315, 7 set. 2022. DOI 10.3390/IJMS231810315. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/18/10315/htm>. Acesso em: 6 jan. 2024.

KHANDIA, R.; SINGHAL, S.; ALQAHTANI, T.; *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant, salient features, high global health concerns and strategies to counter it amid ongoing COVID-19 pandemic. **Environmental Research**, v. 209, p. 112816, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935122001438>. Acesso em: 6 jan. 2024.

KIESSLICH, S.; KAMEN, A. A. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. **Biotechnology Advances**, vol. 44, p. 107608, 15 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2020.107608>. Acesso em: 6 jan. 2024.

KIRTIPAL, Nikhil; BHARADWAJ, Shiv; KANG, Sang Gu. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, p. 104502, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134820303336>. Acesso em: 8 jan. 2024.

KO, W. C.; ROLAIN, J. M.; LEE, N. Y.; CHEN, P. L.; HUANG, C. T.; LEE, P. I.; HSUEH, P. R. Arguments in favour of remdesivir for treating SARS-CoV-2 infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 55, n° 4, p. 105933, 1 abr. 2020.

<https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.105933>. Acesso em: 24 dez. 2023.

KOELLE, K.; MARTIN, M. A.; ANTIA, R.; LOPMAN, B.; DEAN, N. E. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. **Science**, vol. 375, n° 6585, p. 1116–1121, 11 mar. 2022. DOI 10.1126/SCIENCE.ABM4915/ASSET/C0803331-794E-4A56-8544-

AAB9E7C6D8B0/ASSETS/IMAGES/LARGE/SCIENCE.ABM4915-F4.JPG. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abm4915>. Acesso em: 24 dez. 2023.

KONG, Weifang; AGARWAL, Prachi P. Chest Imaging Appearance of COVID-19 Infection. **Radiology: Cardiothoracic Imaging**, v. 2, n. 1, p. e200028, 2020. Disponível em:

<http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/ryct.2020200028>.

KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic Acids Are Absorbed from the Rat Stomach with Different Absorption Rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, n° 20, p. 7539–7543, 1 out. 2006. DOI 10.1021/jf061554+. Disponível em:

<https://doi.org/10.1021/jf061554+>.

KRAMMER, F. SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, vol. 586, n° 7830, p. 516–527, 2020. DOI 10.1038/s41586-020-2798-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>.

KUBIÇA, T. F.; ALVES, S. H.; WEIBLEN, R.; LOVATO, L. T. In vitro inhibition of the bovine viral diarrhoea virus by the essential oil of *Ocimum basilicum* (basil) and monoterpenes. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 45, n° 1, p. 209, 2014. DOI 10.1590/S1517-83822014005000030. Disponível em: </pmc/articles/PMC4059298/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

KUJAWSKI, S. A.; WONG, K. K.; COLLINS, J. P.; EPSTEIN, L.; KILLERBY, M. E.; MIDGLEY, C. M.; ABEDI, G. R.; AHMED, N. S.; ALMENDARES, O.; ALVAREZ, F. N.; ANDERSON, K. N.; BALTER, S.; BARRY, V.; BARTLETT, K.; BEER, K.; BEN-ADERET, M. A.; BENEWITZ, I.; BIGGS, H. M.; BINDER, A. M.; ... TEAM, T. C.-19 I. Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. **Nature Medicine**, vol. 26, n° 6, p. 861–868, 2020. DOI 10.1038/s41591-020-0877-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0877-5>.

KULKARNI, S. A.; NAGARAJAN, S. K.; RAMESH, V.; PALANIYANDI, V.; SELVAM, S. P.; MADHAVAN, T. Computational evaluation of major components from plant essential oils as potent inhibitors of SARS-CoV-2 spike protein. **Journal of Molecular Structure**, vol. 1221, p. 128823, 5 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2020.128823>. Acesso em: 9 jan. 2024.

KUMAR, S.; SARMA, P.; KAUR, H.; PRAJAPAT, M.; BHATTACHARYYA, A.; AVTI, P.; SEHKHAR, N.; KAUR, H.; BANSAL, S.; MAHENDIRATTA, S.; MAHALMANI, V. M.;

SINGH, H.; PRAKASH, A.; KUHAD, A.; MEDHI, B. Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review. **Tissue & cell**, vol. 70, 1 jun. 2021. DOI 10.1016/J.TICE.2021.101497. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33550034/>. Acesso em: 6 jan. 2024.

KUNDUR, S.; PRAYAG, A.; SELVAKUMAR, P.; NGUYEN, H.; MCKEE, L.; CRUZ, C.; SRINIVASAN, A.; SHOYELE, S.; LAKSHMIKUTTYAMMA, A. Synergistic anticancer action of quercetin and curcumin against triple-negative breast cancer cell lines. **Journal of cellular physiology**, vol. 234, n° 7, p. 11103–11118, 1 jul. 2019. DOI 10.1002/JCP.27761.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30478904/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

LAI, W. L.; CHUANG, H. S.; LEE, M. H.; WEI, C. L.; LIN, C. F.; TSAI, Y. C. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. **Planta medica**, vol. 78, n° 15, p. 1636–1638, 2012. DOI 10.1055/S-0032-1315208. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22890541/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

LEE, H.; HEO, L.; LEE, M. S.; SEOK, C. GalaxyPepDock: a protein-peptide docking tool based on interaction similarity and energy optimization. **Nucleic acids research**, vol. 43, n° W1, p. W431–W435, 2015. DOI 10.1093/NAR/GKV495. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25969449/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Current opinion in structural biology**, vol. 6, n° 3, p. 402–406, 1996. DOI 10.1016/S0959-440X(96)80061-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8804827/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

LI, Huifang; XU, Feng; LIU, Chang; *et al.* Inhibitory Effects and Surface Plasmon Resonance-Based Binding Affinities of Dietary Hydrolyzable Tannins and Their Gut Microbial Metabolites on SARS-CoV-2 Main Protease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 41, p. 12197–12208, 2021. Disponível em:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c03521>. Acesso em: 9 jan. 2024.

LI, S. Y.; CHEN, C.; ZHANG, H. Q.; GUO, H. Y.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA, S. N.; YU, J.; XIAO, P. G.; LI, R. S.; TAN, X. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral research**, vol. 67, n° 1, p. 18–23, jul. 2005. DOI 10.1016/J.ANTIVIRAL.2005.02.007. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15885816/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. **Biomedical reports**, vol. 3, n° 5, p. 617–620, set. 2015. DOI 10.3892/BR.2015.481.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26405534/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

LIBRATY, D. H.; ENDY, T. P.; HOUNG, H. H.; *et al.* Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. **The**

**Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213–1221, 2002. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/340365>. Acesso em: 7 jan. 2024.

LIMA, M. C.; PAIVA DE SOUSA, C.; FERNANDEZ-PRADA, C.; HAREL, J.; DUBREUIL, J. D.; DE SOUZA, E. L. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. **Microbial pathogenesis**, vol. 130, p. 259–270, 1 maio 2019. DOI 10.1016/J.MICPATH.2019.03.025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917922/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

LIMA, R. C. de; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. RIO DE JANEIRO, R. Brasil. **Atividade antiviral de extrato de produtos naturais em modelos de infecção in vitro pelos arbovírus dengue e chikungunya**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/51536>. Acesso em: 8 jan. 2024.

LIU, A. [2018]. From old behemoth Lipitor to new king Humira: Best-selling U.S. drugs over 25 years | **Fierce Pharma**. Disponível em: <https://www.fiercepharma.com/pharma/from-old-behemoth-lipitor-to-new-king-humira-u-s-best-selling-drugs-over-25-years>. Acesso em: 14 fev. 2024.

LIU, Y.; YANG, Y.; ZHANG, C.; HUANG, F.; WANG, F.; YUAN, J.; WANG, Z.; LI, J.; LI, J.; FENG, C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; PENG, L.; CHEN, L.; QIN, Y.; ZHAO, D.; TAN, S.; YIN, L.; XU, J.; ... LIU, L. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. **Science China Life Sciences**, vol. 63, n° 3, p. 364–374, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1643-8>.

LOW, Z.; LANI, R.; TIONG, V.; *et al.* COVID-19 Therapeutic Potential of Natural Products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9589, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/11/9589>. Acesso em: 9 jan. 2024.

LUI, G.; GUARALDI, G. Drug treatment of COVID-19 infection. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 29, n. 3, p. 174–183, 2023. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/MCP.0000000000000953>. Acesso em: 6 jan. 2024.

LUIZ, M. B.; PEREIRA, S. S.; PRADO, N. D. R.; GONÇALVES, N. R.; KAYANO, A. M.; MOREIRA-DILL, L. S.; SOBRINHO, J. C.; ZANCHI, F. B.; FULY, A. L.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M.; STABELI, R. G.; FERNANDES, C. F. C. Camelid Single-Domain Antibodies (VHHs) against Crotoxin: A Basis for Developing Modular Building Blocks for the Enhancement of Treatment or Diagnosis of Crotalic Envenoming. **Toxins**, vol. 10, n° 4, 1 abr. 2018. DOI 10.3390/TOXINS10040142. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29596324/>. Acesso em: 6 jan. 2024.

MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. **Malaysian J Pathol**, vol. 42, n° 1, p. 3–11, 2020. . Acesso em: 25 dez. 2023.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American journal of clinical nutrition**, vol. 81, n° 1 Suppl, 2005. DOI 10.1093/AJCN/81.1.230S. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15640486/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

MANOHAR, M.; FATIMA, I.; SAXENA, R.; CHANDRA, V.; SANKHWAR, P. L.; DWIVEDI, A. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells via ROS generation and p38 MAP kinase activation. **The Journal of nutritional biochemistry**, vol. 24, n° 6, p. 940–947, jun. 2013. DOI 10.1016/J.JNUTBIO.2012.06.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22959059/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

MATROSOVICH, M.; MATROSOVICH, T.; GARTEN, W.; KLENK, H.-D. New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. **Virology Journal**, v. 3, n. 1, p. 63, 2006. Disponível em: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-3-63>. Acesso em: 6 jan. 2024.

MATTERA, R.; BENVENUTO, M.; GIGANTI, M. G.; TRESOLDI, I.; PLUCHINOTTA, F. R.; BERGANTE, S.; TETTAMANTI, G.; MASUELLI, L.; MANZARI, V.; MODESTI, A.; BEI, R. Effects of Polyphenols on Oxidative Stress-Mediated Injury in Cardiomyocytes. **Nutrients**, vol. 9, n° 5, 20 maio 2017. DOI 10.3390/NU9050523. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28531112/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

MORRIS, G. M.; RUTH, H.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, vol. 30, n° 16, p. 2785–2791, dez. 2009. DOI 10.1002/JCC.21256. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399780/>. Acesso em: 6 jan. 2024.

MORSE, J. S.; LALONDE, T.; XU, S.; LIU, W. R. Learning from the Past: Possible Urgent Prevention and Treatment Options for Severe Acute Respiratory Infections Caused by 2019-nCoV. **ChemBiochem : a European journal of chemical biology**, vol. 21, n° 5, p. 730–738, 2 mar. 2020. DOI 10.1002/CBIC.202000047. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32022370/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MUÁLEM, M.; ALVES, M.; MOREIRA BRITO, L.; SOUZA, A. C.; PARENTE DE CARVALHO, T.; JOSÉ COSTA VIANA, F.; ARAÚJO, F.; OLIVEIRA, A.; MEDEIROS BARRETO, H.; SARA DE SOUSA, J.; OLIVEIRA, M.; CHAVES, M. H.; DIAS, D.; ARCANJO, R.; AÉCIO, F.; CARVALHO, A. Antimicrobial activity and cytotoxic assessment of gallic and ellagic acids. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, vol. 3, n° 1, p. 17, 8 jun. 2018. DOI 10.26694/JIBI.V3I1.6626. Disponível em: <https://revistas.ufpi.br/index.php/jibi/article/view/11>. Acesso em: 7 jan. 2024.



- NAGOOR MEERAN, M. F.; JAVED, H.; AL TAE, H.; AZIMULLAH, S.; OJHA, S. K. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2017.00380>. Acesso em: 7 jan. 2024.
- NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, nº 20, p. 5735–5741, 25 set. 2002. DOI 10.1021/JF0257547. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0257547>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, vol. 83, nº 3, p. 770–803, 27 mar. 2020. DOI 10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32162523/>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- NYBERG, T.; FERGUSON, N. M.; NASH, S. G.; *et al.* Comparative analysis of the risks of hospitalisation and death associated with SARS-CoV-2 omicron (B.1.1.529) and delta (B.1.617.2) variants in England: a cohort study. **The Lancet**, v. 399, n. 10332, p. 1303–1312, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673622004627>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- ONG, K. W.; HSU, A.; TAN, B. K. H. Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: a contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes. **PloS one**, vol. 7, nº 3, 7 mar. 2012. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0032718. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22412912/>. Acesso em: 25 dez. 2023.
- PAGNO, M. Remédios contra Covid: veja o que foi suspenso, o que está no SUS e as novas promessas contra a doença | Coronavírus | **G1** [2023]. Disponível em: <https://g1.globo.com/saude/coronavirus/noticia/2023/02/28/remedios-contracovid-veja-o-que-foi-suspenso-o-que-esta-no-sus-e-as-novas-promessas-contraa-doenca.ghtml>. Acesso em: 14 fev. 2024.
- PÁJARO-CASTRO, N.; FLECHAS, M. C.; OCASIONEZ, R.; STASHENKO, E.; OLIVERO-VERBEL, J. Potential interaction of components from essential oils with dengue virus proteins. **Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát**, , p. 141–155, 2015. Disponível em: [http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo\\_1\\_-\\_814\\_-\\_141\\_-\\_155.pdf](http://www.blacpma.usach.cl/sites/blacpma/files/articulo_1_-_814_-_141_-_155.pdf). Acesso em: 9 jan. 2024.
- PAN, S. Y.; ZHOU, S. F.; GAO, S. H.; YU, Z. L.; ZHANG, S. F.; TANG, M. K.; SUN, J. N.; MA, D. L.; HAN, Y. F.; FONG, W. F.; KO, K. M. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM'S outstanding contribution to modern therapeutics. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/627375>. Acesso em: 25 dez. 2023.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, p. 270–278, 2009. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2009/897484>

PARK, S. W.; KWON, M. J.; YOO, J. Y.; CHOI, H.-J.; AHN, Y.-J. Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in Lagerstroemia speciosa leaves toward human rhinoviruses. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 171, 2014. Disponível em: <https://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-171>.

PEREIRA, U. A.; MOREIRA, T. A.; BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; BOMFIM, I. S.; MARANHÃO, S. S.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; BARROS-NEPOMUCENO, F. W. A. Rubrolide analogues and their derived lactams as potential anticancer agents. **MedChemComm**, vol. 7, nº 2, p. 345–352, 17 fev. 2016. DOI 10.1039/C5MD00459D. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/md/c5md00459d>. Acesso em: 7 jan. 2024.

PERES, L. A. B.; DELFINO, V. D. A.; MOCELIN, A. J.; TUTIDA, L. A.; FÁVERO, M. E.; MATSUO, T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 30, n. 1, p.48 - 53, 2008.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; *et al.* UCSF CHIMERAX : Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pro.3943>

POLACK, Fernando P.; THOMAS, Stephen J.; KITCHIN, Nicholas; ABSALON, Judith; GURTMAN, Alejandra; LOCKHART, Stephen; PEREZ, John L.; PÉREZ MARC, Gonzalo; MOREIRA, Edson D.; ZERBINI, Cristiano; BAILEY, Ruth; SWANSON, Kena A.; ROYCHOUDHURY, Satrajit; KOURY, Kenneth; LI, Ping; KALINA, Warren V.; COOPER, David; FRENCK, Robert W.; HAMMITT, Laura L.; GRUBER, William C. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **The New England journal of medicine**, vol. 383, nº 27, p. 2603–2615, 31 dez. 2020. DOI 10.1056/NEJMOA2034577. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33301246/>. Acesso em: 14 fev. 2024.

PORRO, C.; CIANCIULLI, A.; TROTTA, T.; LOFRUMENTO, D. D.; PANARO, M. A. Curcumin Regulates Anti-Inflammatory Responses by JAK/STAT/SOCS Signaling Pathway in BV-2 Microglial Cells. **Biology**, vol. 8, nº 3, 1 set. 2019. DOI 10.3390/BIOLOGY8030051. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31252572/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

PROMSONG, A.; CHUENCHITRA, T.; SAIPIN, K.; *et al.* Ellagic acid inhibits HIV -1 infection in vitro : Potential role as a novel microbicide. **Oral Diseases**, v. 24, n. 1–2, p. 249–252, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/odi.12835>.

RAHMAN, MD. M.; RAHAMAN, MD. S.; ISLAM, MD. R.; *et al.* Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 233, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/1/233>

ROMERO, D.; GÓMEZ-ZAPATA, M.; LUNA, A.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. Comparison of cytopathological changes induced by mercury chloride exposure in renal cell lines (VERO and BGM). **Environmental toxicology and pharmacology**, vol. 17, n° 3, p. 129–141, jul. 2004. DOI 10.1016/J.ETAP.2004.03.007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21782724/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

SALIMI, A.; BAGHAL, E.; GHOBADI, H.; *et al.* Mitochondrial, lysosomal and DNA damages induced by acrylamide attenuate by ellagic acid in human lymphocyte. (S. Bera, Org.) **PLOS ONE**, v. 16, n. 2, p. e0247776, 2021. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0247776>. Acesso em: 7 jan. 2024.

SCHUMACHER, D.; HELMA, J.; SCHNEIDER, A. F. L.; LEONHARDT, H.; HACKENBERGER, C. P. R. Nanobodies: Chemical Functionalization Strategies and Intracellular Applications. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, vol. 57, n° 9, p. 2314–2333, 23 fev. 2018. DOI 10.1002/ANIE.201708459. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28913971/>. Acesso em: 6 jan. 2024.

SELIM, S.; ALBQMI, M.; ALANAZI, A.; ALRUWAILI, Y.; AL-SANEA, M. M.; ALNUSAIRE, T. S.; ALMUHAYAWI, M. S.; AL JAOUNI, S. K.; HUSSEIN, S.; WARRAD, M.; ABDELGAWAD, H.; ELSHAFFEY, N.; ELNOSARY, M. E. Antiviral activities of olive oil apigenin and taxifolin against SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase (RdRP): In silico, pharmacokinetic, ADMET, and in-vitro approaches. **Cogent Food & Agriculture**, vol. 9, n° 1, 31 dez. 2023. DOI 10.1080/23311932.2023.2236828. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/23311932.2023.2236828>. Acesso em: 9 jan. 2024.

SHALDAM, M. A.; YAHYA, G.; MOHAMED, N. H.; ABDEL-DAIM, M. M.; AL NAGGAR, Y. In silico screening of potent bioactive compounds from honeybee products against COVID-19 target enzymes. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 28, n° 30, p. 40507–40514, 1 ago. 2021. DOI 10.1007/S11356-021-14195-9/FIGURES/4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-021-14195-9>. Acesso em: 9 jan. 2024.

SHAN, Y.; KIM, E. T.; EASTWOOD, M. P.; DROR, R. O.; SEELIGER, M. A.; SHAW, D. E. How does a drug molecule find its target binding site? **Journal of the American Chemical Society**, vol. 133, n° 24, p. 9181–9183, 22 jun. 2011. DOI 10.1021/JA202726Y/SUPPL\_FILE/JA202726Y\_SI\_002.PDF. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja202726y>. Acesso em: 9 jan. 2024.

SHANG, J.; WAN, Y.; LUO, C.; YE, G.; GENG, Q.; AUERBACH, A.; LI, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

**United States of America**, vol. 117, n° 21, 26 maio 2020. DOI 10.1073/PNAS.2003138117. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32376634/>. Acesso em: 24 dez. 2023.

SHARIFI-RAD, J.; SALEHI, B.; SCHNITZLER, P.; AYATOLLAHI, S. A.; KOBARFARD, F.; FATHI, M.; EISAZADEH, M.; SHARIFI-RAD, M. Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleana* Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, vol. 63, n° 8, p. 42–47, 2017. DOI 10.14715/CMB/2017.63.8.10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28886313/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

SHARIFI-RAD, Javad; QUISPE, C.; CASTILLO, C. M. S.; CAROCA, R.; LAZO-VÉLEZ, M. A.; ANTONYAK, H.; POLISHCHUK, A.; LYSIUK, R.; OLIINYK, P.; DE MASI, L.; BONTEMPO, P.; MARTORELL, M.; DAŞTAN, S. D.; RIGANO, D.; WINK, M.; CHO, W. C. Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2022, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3848084>. Acesso em: 25 dez. 2023.

SHIN, M.; KANG, E.; LEE, Y. A flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretion in HBV-infected hepatocytes. **Antiviral Research**, v. 67, n. 3, p. 163–168, 2005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354205001233>.

SHURTLEFF, A.; BIGGINS, J.; KEENEY, A.; *et al.* Standardization of the Filovirus Plaque Assay for Use in Preclinical Studies. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3511–3530, 2012. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/4/12/3511>. Acesso em: 25 dez. 2023.

SOFOWORA, A.; OGUNBODEDE, E.; ONAYADE, A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM**, vol. 10, n° 5, p. 210–229, 2013. DOI 10.4314/AJTCAM.V10I5.2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24311829/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

SON, M.; LEE, M.; SUNG, G. H.; LEE, T.; SHIN, Y. S.; CHO, H.; LIEBERMAN, P. M.; KANG, H. Bioactive activities of natural products against herpesvirus infection. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, vol. 51, n° 5, p. 545–551, 2013. DOI 10.1007/S12275-013-3450-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24173639/>. Acesso em: 8 jan. 2024.

STELZER-BRAID, S.; WALKER, G. J.; AGGARWAL, A.; ISAACS, S. R.; YEANG, M.; NAING, Z.; OSPINA STELLA, A.; TURVILLE, S. G.; RAWLINSON, W. D. Virus isolation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) for diagnostic and research purposes. **Pathology**, vol. 52, n° 7, p. 760–763, 1 dez. 2020. DOI 10.1016/J.PATHOL.2020.09.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33131800/>. Acesso em: 6 jan. 2024.

SUPIAN, S.; AHMAD, M. A.; ROZANO, L.; CHANDRADEVAN, M.; AB RAHMAN, Z. *Phyllanthus tenellus* Roxb. And *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 main protease and RNA-dependent RNA polymerase: A molecular

docking study. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, vol. 10, n° 6, p. 1103–1116, 1 nov. 2022. [https://doi.org/10.56499/JPPRES22.1485\\_10.6.1103](https://doi.org/10.56499/JPPRES22.1485_10.6.1103). Acesso em: 9 jan. 2024.

SURUČIĆ, R.; TRAVAR, M.; PETKOVIĆ, M.; *et al.* Pomegranate peel extract polyphenols attenuate the SARS-CoV-2 S-glycoprotein binding ability to ACE2 Receptor: In silico and in vitro studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 114, p. 105145, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206821005228>. Acesso em: 9 jan. 2024.

SWALLAH, M. S.; SUN, H.; AFFOH, R.; FU, H.; YU, H. Antioxidant Potential Overviews of Secondary Metabolites (Polyphenols) in Fruits. **International journal of food science**, vol. 2020, 2020. DOI 10.1155/2020/9081686. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32455130/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

TAKSHAK, S.; AGRAWAL, S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, vol. 193, p. 51–88, 1 abr. 2019. DOI 10.1016/J.JPHOTOBIOL.2019.02.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30818154/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

TEPLOVA, V. V.; ISAKOVA, E. P.; KLEIN, O. I.; DERGACHOVA, D. I.; GESSLER, N. N.; DERYABINA, Y. I. Natural Polyphenols: Biological Activity, Pharmacological Potential, Means of Metabolic Engineering (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology** **2018** **54:3**, vol. 54, n° 3, p. 221–237, 1 jun. 2018. DOI 10.1134/S0003683818030146. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0003683818030146>. Acesso em: 25 dez. 2023.

TIAN, L.; SU, C. P.; WANG, Q.; WU, F. J.; BAI, R.; ZHANG, H. M.; LIU, J. Y.; LU, W. J.; WANG, W.; LAN, F.; GUO, S. Z. Chlorogenic acid: A potent molecule that protects cardiomyocytes from TNF- $\alpha$ -induced injury via inhibiting NF- $\kappa$ B and JNK signals. **Journal of cellular and molecular medicine**, vol. 23, n° 7, p. 4666–4678, 1 jul. 2019. DOI 10.1111/JCMM.14351. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31033175/>. Acesso em: 7 jan. 2024.

TISSUE EXPRESSION OF ACE2 - SUMMARY - THE HUMAN PROTEIN ATLAS. [*s. d.*]. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130234-ACE2/tissue>. Acesso em: 7 jan. 2024.

TSAI, P. W.; TAYO, L. L.; TING, J. U.; HSIEH, C. Y.; LEE, C. J.; CHEN, C. L.; YANG, H. C.; TSAI, H. Y.; HSUEH, C. C.; CHEN, B. Y. Interactive deciphering electron-shuttling characteristics of Coffea arabica leaves and potential bioenergy-steered anti-SARS-CoV-2 RdRp inhibitor via microbial fuel cells. **Industrial Crops and Products**, vol. 191, p. 115944, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2022.115944>. Acesso em: 9 jan. 2024.

UN NEWS. COVID ‘SHOT FOR ALL’, NOT A LUXURY, BUT DEVELOPMENT PRIORITY: UNDP | UN NEWS. [2021]. Disponível em: <https://news.un.org/en/story/2021/09/1100552>. Acesso em: 14 fev. 2024.

UPADHYAY, R.; MOHAN RAO, L. J. An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. **Critical reviews in food science and nutrition**, vol. 53, n° 9, p. 968–984, jan. 2013. DOI 10.1080/10408398.2011.576319. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23768188/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural Products: Perspectives and Challenges for use of Brazilian Plant Species in the Bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 91, p. e20190208, 8 ago. 2019. DOI 10.1590/0001-3765201920190208. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/wrPXs78LCJtkcLc3y8kfdbf/abstract/?lang=en>. Acesso em: 25 dez. 2023.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E.; BERENDSEN, H. J. C. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of computational chemistry**, vol. 26, n° 16, p. 1701–1718, dez. 2005. DOI 10.1002/JCC.20291. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16211538/>. Acesso em: 6 jan. 2024.

VAZQUEZ-ARMENTA, F. J.; LEYVA, J. M.; MATA-HARO, V.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; ESQUEDA, M.; GUTIERREZ, A.; NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; GAITÁN-HERNÁNDEZ, R.; AYALA-ZAVALA, J. F. Phenolic compounds of *Phellinus* spp. with antibacterial and antiviral activities. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, vol. 53, n° 3, 2022. DOI 10.1007/S42770-022-00745-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35380361/>. Acesso em: 25 dez. 2023.

WANG, B.; LI, R.; LU, Z.; HUANG, Y. Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis. **Ageing**, v. 12, n. 7, p. 6049–6057, 2020. Disponível em: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.103000>. Acesso em: 7 jan. 2024.

WANG, J.; WITTE, F.; XI, T.; ZHENG, Y.; YANG, K.; YANG, Y.; ZHAO, D.; MENG, J.; LI, Y.; LI, W.; CHAN, K.; QIN, L. Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. **Acta Biomaterialia**, vol. 21, p. 237–249, 15 jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2015.04.011>. Acesso em: 7 jan. 2024.

WANG, L.; PAN, X.; JIANG, L.; CHU, Yu; GAO, S.; JIANG, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; LUO, S.; PENG, C. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. **Frontiers in Nutrition**, vol. 9, p. 943911, 29 Jun. 2022. DOI 10.3389/fnut.2022.943911. Acesso em: 7 jan. 2024.

WANG, Y.; ANIRUDHAN, V.; DU, R.; CUI, Q.; RONG, L. RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target. **Journal of medical virology**, vol. 93, n° 1, p. 300–310, 1 jan. 2021. DOI 10.1002/JMV.26264. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32633831/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

WEN, W.; CHEN, C.; TANG, J.; WANG, C.; ZHOU, M.; CHENG, Y.; ZHOU, X.; WU, Q.; ZHANG, X.; FENG, Z.; WANG, M.; MAO, Q. Efficacy and safety of three new oral antiviral

treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals of Medicine**, vol. 54, n° 1, p. 516–523, 2022a.

<https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2034936>.

WEN, W.; CHEN, C.; TANG, J.; WANG, C.; ZHOU, M.; CHENG, Y.; ZHOU, X.; WU, Q.; ZHANG, X.; FENG, Z.; WANG, M.; MAO, Q. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19 : a meta-analysis. **Annals of Medicine**, vol. 54, n° 1, p. 516–523, 2022b.

<https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2034936>.

WHO STUDY GROUP ON BIOLOGICALS & WORLD HEALTH ORGANIZATION.

Acceptability of cell substrates for production of biologicals : report of a WHO study group [meeting held in Geneva from 18 to 19 November 1986]. 1987. Disponível em:

<https://iris.who.int/handle/10665/38501>. Acesso em: 6 jan. 2024.

WHO. Coronavirus disease (COVID-19) situation report – 108 [report] 2020. Disponível em: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200507covid-19-sitrep-108.pdf?sfvrsn=44cc8ed8\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200507covid-19-sitrep-108.pdf?sfvrsn=44cc8ed8_2). Acesso em: 27 nov. 2023.

WHO. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. 11 mar. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 27 nov. 2023.

WIERSINGA, W. J.; RHODES, A.; CHENG, A. C.; PEACOCK, S. J.; PRESCOTT, H. C. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, vol. 324, n° 8, p. 782–793, 25 ago. 2020. DOI 10.1001/jama.2020.12839. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>.

WOROBAY, M.; LEVY, J. I.; SERRANO, L. M.; CRITS-CHRISTOPH, A.; PEKAR, J. E.; GOLDSTEIN, S. A.; RASMUSSEN, A. L.; KRAEMER, M. U. G.; NEWMAN, C.; KOOPMANS, M. P. G.; SUCHARD, M. A.; WERTHEIM, J. O.; LEMEY, P.; ROBERTSON, D. L.; GARRY, R. F.; HOLMES, E. C.; RAMBAUT, A.; ANDERSEN, K. G. The Huanan Seafood Wholesale Market in Wuhan was the early epicenter of the COVID-19 pandemic. **Science**, vol. 377, n° 6609, p. 951–959, 2022. DOI 10.1126/science.abp8715. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abp8715>.

WU, C.; LIU, Y.; YANG, Y.; ZHANG, P.; ZHONG, W.; WANG, Y.; WANG, Q.; XU, Y.; LI, M.; LI, X.; ZHENG, M.; CHEN, L.; LI, H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, vol. 10, n° 5, p. 766–788, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2020.02.008>. Acesso em: 25 dez. 2023.

XIONG, H.; CHENG, J.; JIANG, S.; WEN, J.; JIAN, Y.; WEI, L.; ZHE, Z.; FU-QIANG, J.; PENG, X. The antitumor effect of resveratrol on nasopharyngeal carcinoma cells. **Frontiers**

in **Bioscience (Landmark Edition)**, vol. 24, n° 5, p. 961–970, 1 mar. 2019. DOI 10.2741/4761. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/30844723>. Acesso em: 25 dez. 2023.

XU, H. T.; HASSOUNAH, S. A.; COLBY-GERMINARIO, S. P.; OLIVEIRA, M.; FOGARTY, C.; QUAN, Y.; HAN, Y.; GOLUBKOV, O.; IBANESCU, I.; BRENNER, B.; STRANIX, B. R.; WAINBERG, M. A. Purification of Zika virus RNA-dependent RNA polymerase and its use to identify small-molecule Zika inhibitors. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, vol. 72, n° 3, p. 727–734, 1 mar. 2017. DOI 10.1093/JAC/DKW514. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28069884/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

YANG, L. J.; CHEN, R. H.; HAMDOUN, S.; COGHI, P.; NG, J. P. L.; ZHANG, D. W.; GUO, X.; XIA, C.; LAW, B. Y. K.; WONG, V. K. W. Corilagin prevents SARS-CoV-2 infection by targeting RBD-ACE2 binding. **Phytomedicine**, vol. 87, p. 153591, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2021.153591>. Acesso em: 9 jan. 2024.

YEK, Christina; WARNER, Sarah; WILTZ, Jennifer L.; SUN, Junfeng; ADJEI, Stacey; MANCERA, Alex; SILK, Benjamin J.; GUNDLAPALLI, Adi V.; HARRIS, Aaron M.; BOEHMER, Tegan K.; KADRI, Sameer S. Risk Factors for Severe COVID-19 Outcomes Among Persons Aged  $\geq 18$  Years Who Completed a Primary COVID-19 Vaccination Series - 465 Health Care Facilities, United States, December 2020-October 2021. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, vol. 71, n° 1, p. 19–25, 7 jan. 2022. DOI 10.15585/MMWR.MM7101A4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34990440/>. Acesso em: 14 fev. 2024.

YILDIRIM, I.; KUTLU, T.; TAKIM, K. Comparison of antioxidant activity of rheum ribes fruits and seed methanolic extracts against protein oxidation and lipid peroxidation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol. 18, n° 5, p. 232–239, 29 ago. 2015. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2015.232.239>. Acesso em: 25 dez. 2023.

YU, J.; WANG, L.; BAO, L. Exploring the active compounds of traditional Mongolian medicine in intervention of novel coronavirus (COVID-19) based on molecular docking method. *Journal of Functional Foods*, v. 71, p. 104016, ago. 2020

ZEGGINI, Eleftheria; BAUMANN, Michael; GÖTZ, Magdalena; *et al.* Biomedical Research Goes Viral: Dangers and Opportunities. **Cell**, v. 181, n. 6, p. 1189–1193, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420305766>. Acesso em: 3 fev. 2024.

ZERAIK, M. L.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; CICLET, O.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CUENDET, M.; DA SILVA BOLZANI, V.; WOLFENDER, J. L. Antioxidants, quinone reductase inducers and acetylcholinesterase inhibitors from *Spondias tuberosa* fruits. **Journal of Functional Foods**, vol. 21, p. 396–405, 1 mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.12.009>. Acesso em: 25 dez. 2023.



ZHANG, D.; HAMDOUN, S.; CHEN, R.; *et al.* Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with bio-layer interferometry. *Pharmacological Research*, v. 172, p. 105820, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661821004047>

ZHANG, J.; ZHOU, L.; YANG, Y.; PENG, W.; WANG, W.; CHEN, X. Therapeutic and triage strategies for 2019 novel coronavirus disease in fever clinics. **The Lancet Respiratory**, vol. 8, p. e11–e12, 2020. DOI 10.1016/S2213-2600(20)30071-0. Disponível em: <https://www.who.int/publications>.

ZHAO, X.; CUI, Q.; FU, Q.; SONG, X.; JIA, R.; YANG, Y.; ZOU, Y.; LI, L.; HE, C.; LIANG, X.; YIN, L.; LIN, J.; YE, G.; SHU, G.; ZHAO, L.; SHI, F.; LV, C.; YIN, Z. Antiviral properties of resveratrol against pseudorabies virus are associated with the inhibition of I $\kappa$ B kinase activation. **Scientific Reports 2017 7:1**, vol. 7, nº 1, p. 1–11, 18 ago. 2017. DOI 10.1038/s41598-017-09365-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-09365-0>. Acesso em: 25 dez. 2023.

ZHOU, Wei; LIU, Y.; TIAN, D.; WANG, C.; WANG, S.; CHENG, J.; HU, M.; FANG, M.; GAO, Y. Potential benefits of precise corticosteroids therapy for severe 2019-nCoV pneumonia. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 5, nº 1, p. 18, 2020. DOI 10.1038/s41392-020-0127-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0127-9>.

ZHOU, Weilin; WANG, W. Fast-spreading SARS-CoV-2 variants: challenges to and new design strategies of COVID-19 vaccines. **Signal Transduction and Targeted Therapy 2021 6:1**, vol. 6, nº 1, p. 1–6, 9 jun. 2021. DOI 10.1038/s41392-021-00644-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-021-00644-x>. Acesso em: 24 dez. 2023.

ZHOU, Z.; LIU, T.; ZHANG, J.; ZHAN, P.; LIU, X. Influenza A virus polymerase: an attractive target for next-generation anti-influenza therapeutics. **Drug Discovery Today**, vol. 23, nº 3, p. 503–518, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.01.028>. Acesso em: 9 jan. 2024.

ZUMLA, A.; HUI, D. S.; AZHAR, E. I.; MEMISH, Z. A.; MAEURER, M. Reducing mortality from 2019-nCoV: host-directed therapies should be an option. **The Lancet**, vol. 395, nº 10224, p. e35–e36, 22 fev. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30305-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30305-6).