



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

VÂNIA CARLA DE SOUSA

ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DE COMPOSTOS NATURAIS COMO
POTENCIAIS ALTERNATIVAS CONTRA O SARS-CoV-2

FORTALEZA

2023

VÂNIA CARLA DE SOUSA

ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DE COMPOSTOS NATURAIS COMO
POTENCIAIS ALTERNATIVAS CONTRA O SARS-CoV-2

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

Orientador: Prof. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Carla Freire Celedonio Fernandes.

FORTALEZA

2023

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)

Sousa, Vânia Carla de.

Atividade antiviral in vitro de compostos naturais como potenciais alternativas contra o sars-cov-2 / Vânia Carla de Sousa. – 2023.

60 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Cléberson de Freitas Fernandes.

Coorientação: Prof. Dr. Carla Freire Celedonio Fernandes.

1. Vitamina E. 2. SARS-CoV-2. 3. COVID-19. 4. Produtos naturais. I. Título.

CDD 660.6

VÂNIA CARLA DE SOUSA

ATIVIDADE ANTIVIRAL IN VITRO DE COMPOSTOS NATURAIS COMO
POTENCIAIS ALTERNATIVAS CONTRA O SARS-CoV-2

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

Aprovada em: 26 de julho de 2023

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Daniel Pascoalino Pinheiro
Fundação Oswaldo Cruz, Ceará

Prof.^a Dra. Soraya dos Santos Pereira
Fundação Oswaldo Cruz, Rondônia

A Deus.

Ao meu Pai (*in memoriam*) eu andaria todas as distâncias do mundo, só para ter cinco minutos do seu tempo, do seu abraço, do seu cheiro e atenção.

AGRADECIMENTOS

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

A 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.

Agradecimento especial à minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*) por terem feito todo o possível para que eu concluísse meu trabalho. Meu pai morreu no ano passado, mas está sempre presente comigo.

A Dra. Larissa Pontes, minha corretora oficial, que me ajudou e ensinou quase tudo que sei sobre cultura de células, além de me acompanhar a fazer em cada etapa no desenvolvimento deste trabalho.

A Sarah Elizabeth que foi um presente que a vida e a biotecnologia me proporcionaram.

A Dra. Daniela e Dra. Karine por todo apoio e incentivo desde a primeira etapa em minha vida de pós-graduanda e continuidade na vida, obrigada por tanto.

Ao Dr. Cléber (orientador) e Dra. Carla (coorientadora) por todo apoio e suporte.

As meninas da Dra. Carla: Camila, Vívian, Lívia, Bruni e Duda e pelo acolhimento.

A minha linda e loira índia Potira do centro sul, Larisse.

Aos técnicos: Marcelo, Mayara, Rosa, Venúcia e Maurício pela disponibilidade de me ajudarem sempre.

Camila Alves por ser meu ponto de apoio, conversas que edifica e apostas que nunca seguem em frente.

A minha amada irmã Vanderli e toda minha família.

“Sic parvis magna. Invenio e fascio
Grandeza a partir de pequenos começos.
Encontro um jeito e faço!”. (Sir Francis
Drake)

RESUMO

Em março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a pandemia da Covid-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, tornando-se um problema global sem precedentes na saúde humana, na estabilidade social e, posteriormente, um problema socioeconômico. Os produtos naturais e suas moléculas estruturais têm contribuído historicamente à farmacoterapia, atuando como fonte de moléculas com diferentes atividades biológicas, enfatizando sua ação contra câncer, doenças infecciosas e potentes inibidores antivirais. Nesse contexto, a biodiversidade brasileira, dada a sua riqueza, se apresenta como fonte promissora na bioprospecção e no desenvolvimento de moléculas com potencial aplicações biológicas. Nesse trabalho foram avaliados os flavonoides: caempferol e alfa-bisabolol, assim como a vitamina E (alfa-tocoferol), quanto ao seu potencial como agente antiviral. Para tanto, foram conduzidos ensaios *in vitro* para avaliar o potencial citotóxico das moléculas por ensaios de MTT e, posteriormente, ensaios de neutralização viral PRNT em linhagem de células Vero contra a linhagem Delta do SAR-CoV-2. A partir dos ensaios de citotoxicidade foram determinadas as concentrações, para cada molécula, com potencial citotóxico inferior a 30%, sendo 25, 6,25 e 6,25 mg/mL para alfa-tocoferol, caempferol e alfa-bisabolol, respectivamente. Essas concentrações foram utilizadas nos ensaios de neutralização viral. Os resultados de neutralização viral PRNT, quando em contato diretamente com o vírus, mostraram percentual de inibição de 98,2%, 20,8% e 8,8% para o alfa-tocoferol, caempferol e alfa-bisabolol, respectivamente. Visando avaliar o possível mecanismo de ação da molécula, ensaios *in silico* de ancoragem molecular foram realizados contra três alvos de proteínas virais de RNA polimerase RdRp, M^{pro} e Spike. Na ancoragem molecular, o alfa-tocoferol obteve melhor desempenho de energia, seguido pelo caempferol e alfa-bisabolol, com o diferencial que, o alfa-tocoferol obteve triplo modo de ação M^{pro}, RdRp e Spike. O presente trabalho apresentou a atividade antiviral anti-SARS-CoV-2, *in vitro*, do alfa-tocoferol, assim como sua interação com sítios de importância na replicação viral, podendo indicar o potencial dessa molécula no tratamento da Covid-19, enfatizando, assim, a importância de estudos que visem estabelecer novas alternativas para descoberta de agentes antivirais.

Palavras-chave: vitamina E; SARS-CoV-2; COVID-19; produtos naturais.

ABSTRACT

In March 2020, the World Health Organization (WHO) declared the Covid-19 pandemic, caused by the SARS-CoV-2 virus, becoming an unprecedented global problem in human health, social stability and, subsequently, a socioeconomic problem. Natural products and their structural molecules have historically contributed to pharmacotherapy, acting as a source of molecules with different biological activities, emphasizing their action against cancer, infectious diseases, and potent antiviral inhibitors. In this context, Brazilian biodiversity, given its richness, presents itself as a promising source in bioprospecting and in the development of molecules with potential biological applications. This work, the flavonoids: kaempferol and alpha-bisabolol, as well as vitamin E (alpha-tocopherol), were evaluated for their potential as an antiviral agent. For this purpose, *in vitro* assays were conducted to evaluate the cytotoxic potential of the molecules by MTT assays and, later, PRNT viral neutralization assays in Vero cell line against the Delta lineage of SAR-CoV-2. From the cytotoxicity assays, the concentrations were determined for each molecule with a cytotoxic potential lower than 30%, being 25, 6.25 and 6.25 mg/mL for alpha-tocopherol, kaempferol and alpha-bisabolol, respectively. These concentrations were used in viral neutralization assays. The PRNT viral neutralization results, when in direct contact with the virus, showed an inhibition percentage of 98.2%, 20.8% and 8.8% for alpha-tocopherol, kaempferol and alpha-bisabolol, respectively. To evaluate the possible mechanism of action of the molecule, *in silico* molecular docking assays were performed against three targets of viral RNA polymerase proteins RdRp, M^{Pro} and Spike. In molecular anchoring, alpha-tocopherol obtained the best energy performance, followed by kaempferol and alpha-bisabolol, with the difference that alpha-tocopherol obtained a triple mode of action M^{Pro}, RdRp and Spike. The present work presented the *in vitro* anti-SARS-CoV-2 antiviral activity of alpha-tocopherol, as well as its interaction with sites of importance in viral replication, which may indicate the potential of this molecule in the treatment of Covid-19, thus emphasizing the importance of studies aimed at establishing new alternatives for the discovery of antiviral agents.

Keywords: vitamin E; SARS-CoV-2; COVID-19; natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Organização do genoma do SARS-CoV-2 e as diferentes proteínas codificadas por vários genes.....	13
Figura 2 –	Ciclo de vida do SARS-CoV-2.....	15
Figura 3 –	Produtos naturais utilizados como medicamentos identificados no século passado.....	18
Figura 4 –	Infraestrutura do laboratório NB3, LACEN-CE. a) Corredor de acesso ao NB3; b) Medidor de pressão; c) <i>Pass Through</i> ; d) Porta de acesso; e) Portas de entrada e saída; e f) interior do NB3.....	26
Figura 5 –	PRNT da titulação do SARS-CoV-2 nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , respectivamente, da esquerda para a direita.....	28
Figura 6 –	PRNT para determinação do IC50.....	30
Figura 7 –	Teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-di-fenil brometo de tetrazolium).....	32
Figura 8 –	Gráfico de concentração das moléculas testadas.....	34
Figura 9 –	Gráficos logarítmico da atividade citotóxica dos compostos: Alfa-tocoferol (A), Caempferol (B) e Alfa-bisabolol (C).....	35
Figura 10 –	Teste PRNT com incubação prévia das moléculas com células VERO.....	36
Figura 11 –	PRNT para verificar se as moléculas tiveram atividade antiviral.....	37
Figura 12 -	Gráfico amostra + células.....	38
Figura 13 –	Gráfico PRNT com incubação das moléculas candidatas com o SARS-CoV-2.....	38
Figura 14 -	Gráfico da concentração inibitória IC50.....	39
Figura 15 –	Ancoragem molecular do alfa-tocoferol contra a Proteína RdRp.....	42
Figura 16 –	Ancoragem molecular do alfa-tocoferol contra a Proteína Spike.....	44
Figura 17 –	Ancoragem molecular do alfa-tocoferol contra a proteína M ^{PRO}	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resumo das variantes de preocupação.....	16
Tabela 2 –	Moléculas candidatas de SARS-CoV-2 usadas em bioensaios <i>in vitro</i>	33
Tabela 3 –	Simulação de ancoragem nos ligantes dos alvos RdRp, Spike e M ^{PRO}	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Coronavírus.....	11
1.2	SARS-CoV-2, sua organização genômica, proteínas estruturais e ciclo de vida.....	12
1.3	Ciclo de vida do SARS-CoV-2.....	14
1.4	Variantes.....	15
1.5	Biodiversidade Brasileira.....	17
1.6	Produtos Naturais.....	19
2	JUSTIFICATIVA.....	22
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos Específicos.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Obtenção das moléculas.....	24
4.2	Teste de Citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolium).....	24
4.3	Local da Experimentação.....	25
4.4	Obtenção do SARS-CoV-2.....	27
4.5	Isolamento Viral.....	27
4.6	Titulação Viral - PFU - “Plaque formation units” e Identificação da variante.....	27
4.7	Determinação da Variante Viral.....	29
4.8	Teste de Neutralização Viral PRNT.....	29
4.9	Ancoragem Molecular.....	30
4.10	Análises Estatísticas.....	31
5	RESULTADOS.....	32
5.1	Citotoxicidade das moléculas.....	32
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Após mais de dois anos do início do surto da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), a pandemia continua a prejudicar a estabilidade social e econômica humana em países e regiões em todo o mundo (ZENG; CHEN; LIU, 2022). De acordo com as estatísticas de vigilância relatadas pelo *World corona tracker*, até 27 de junho de 2023, no mundo, a pandemia causou, aproximadamente 700.000.000 de casos de infecção confirmados, com mais de 7.000.000 de mortes (<https://www.worldometers.info/coronavirus>). Pelo Painel Coronavírus, até 27 de junho de 2023, a pandemia causou aproximadamente 38.000.000 milhões de casos de infecção confirmados, com 703.964 mil de mortes no Brasil (<https://covid.saude.gov.br/>). A doença é contagiosa e potencialmente fatal, especialmente para indivíduos com sistema imunológico enfraquecido, ou comorbidades associadas, como diabetes, pneumonia, doença cardíaca ou doença imunossupressora (HASSAN *et al.*, 2020; HANNA *et al.*, 2021).

1.1 Coronavírus

O surto da doença emergente do coronavírus 2, síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) (COVID-19), na China, trouxe atenção ao mundo e foi declarada pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020. Os avanços científicos desde a pandemia da síndrome respiratória aguda grave (SARS) em 2002~2003 e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), em 2012, contribuíram à compreensão da epidemiologia e patogênese do SARS-CoV-2 e o desenvolvimento de terapêuticas para tratar a infecção viral (JIN *et al.*, 2020). Chlamydas e colaboradores descreveram o surto de doença por coronavírus 2019 (COVID-2019), originado em dezembro de 2019 em Wuhan, na China, e que emergiu como uma ameaça global à saúde humana.

A infecção e transmissão altamente contagiosa por SARS-CoV-2 apresenta uma diversidade de hospedeiros humano e aumento do risco de doença com o avanço da idade, destacando a importância de uma compreensão aprofundada de suas propriedades biológicas. Análises estruturais elucidaram pontos-chaves em domínios de ligação viral, mutações e proteínas específicas no hospedeiro, como o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e a serina 2 da protease transmembrana

(TMPRSS2) a serem implicados na entrada celular e na infectividade viral. Além disso, as alterações epigenéticas que regulam a estrutura da cromatina mostraram um grande impacto na estabilização do genoma e na manutenção da homeostase celular e têm sido implicadas na fisiopatologia da infecção pelo vírus (CHLAMYDAS; PAPAVALASSILIOU; PIPERI, 2021).

1.2 SARS-CoV-2, sua organização genômica, proteínas estruturais e ciclo de vida

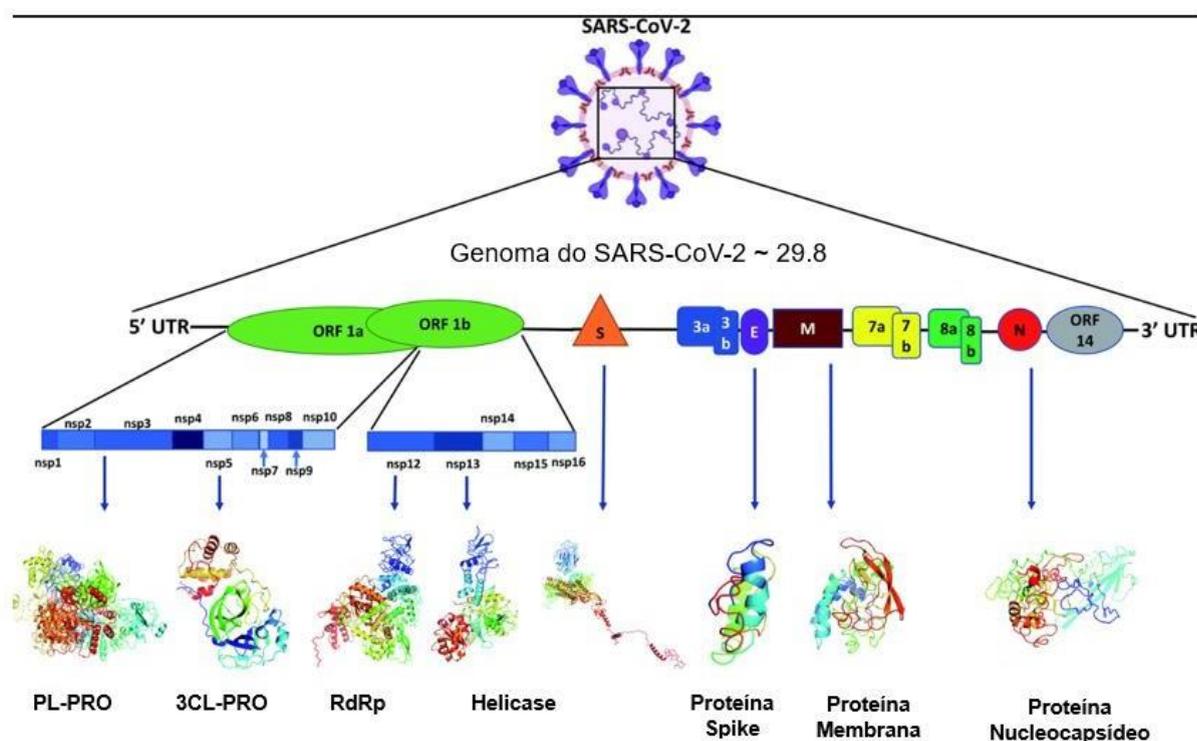
O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de *RNA de sentido positivo* (são fitas que contém o código que será traduzido pelos ribossomos), não segmentado, do subgênero *Sarbecovirus* e da subfamília *Orthocoronavirinae*, amplamente distribuído em humanos e outros mamíferos (morcegos).

A família *Coronaviridae*, contém quatro gêneros: Alpha-coronavírus, Beta-coronavírus, Gamma-coronavírus e Delta-coronavírus. O SARS-CoV-2 e suas variantes pertencem à linhagem β -coronavírus. O *vírion* (partícula viral completa que consiste em RNA cercado por uma proteína, constituindo a forma infectante de um vírus), tem um vírus do genoma do ácido ribonucleico (RNA) de fita simples de 27 a 31 Kb encapsulado por um envelope de membrana dando uma forma de coroa, que codificam proteínas estruturais e acessórias (JIN *et al.*, 2020).

A caracterização e determinação da estrutura e organização genômica do SARS-CoV-2, ajuda a entender e explicar o mecanismo de infecção e mutação viral, que conta com um genoma de aproximadamente 30kb (CHAKRAVARTI *et al.*, 2021).

A organização do genoma consiste em quadro de leitura aberta (ORFs), e tem início em uma região não traduzida (UTR) do terminal 5' e termina em 3' UTR, e desempenham papel significativo na ligação e tradução entre o vírus e a célula hospedeira. A primeira ORF (1a/1b), localizada no 5'-UTR, contém dois terços do genoma, codifica as poliproteínas (NSPs), o restante do genoma 3'-UTR, codifica quatro proteínas estruturais a glicoproteína spike (S), a glicoproteína de membrana (M), a proteína do envelope (E) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (ZHOU; ZHU; CHU, 2022).

Figura 1 - Organização do genoma do SARS-CoV-2 e as diferentes proteínas codificadas por vários genes



Fonte: Adaptado de (CHAKRAVARTI *et al.*, 2021).

Estudos indicam que a proteína glicosilada Spike (S) apresenta alta afinidade ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e parece mediar o processo de infecção viral. Proteínas virais que atuam na replicação do SARS-CoV-2, as enzimas M^{pro} e 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 (CHAKRAVARTI *et al.*, 2021).

Dos 16 NSPs do SARS-CoV-2, quatro NSPs primários são NSP3 ou papaína como protease 3, NSP5 ou 3C como proteinase, NSP12 ou RdRp e NSP13 ou helicase. A proteinase semelhante à papaína ou NSP3 é uma proteína de 200 kDa que é responsável pela clivagem no terminal N da poliproteína replicase. Este maior NSP com 1945 resíduos de aminoácidos, *ou seja*, NSP3 junto com NSP4, desempenha um papel essencial na replicação viral ao montar as vesículas citoplasmáticas de dupla membrana (CHAKRAVARTI *et al.*, 2021).

1.3 Ciclo de vida do SARS-CoV-2

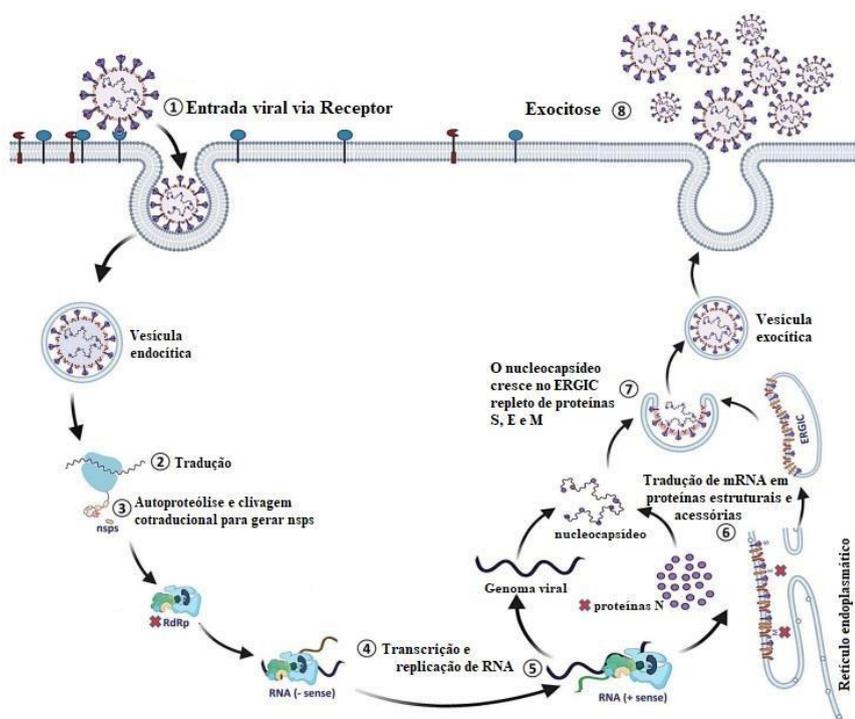
Conforme descrito nos estudos de (CHLAMYDAS; PAPAVALASSILIOU; PIPERI, 2021) o SARS-CoV-2 pode entrar na célula hospedeira *através da* fusão do endossomo e da membrana plasmática. A proteína spike do SARS-CoV-2 liga-se à membrana da célula hospedeira ligando-se ao Receptor 2 da Enzima Conversora de Angiotensina (ACE2). Para entrar na célula hospedeira, o SARS-CoV-2 precisa da serina protease das células hospedeiras, TMPRSS2, para ativar a proteína spike e clivar o receptor ACE2 que finalmente facilita a ligação do SARS-CoV-2 à membrana celular da célula hospedeira e inicia a fusão viral e membrana plasmática.

Após a entrada, o RNA viral é liberado na célula hospedeira e as poliproteínas virais são traduzidas usando o ribossomo da célula hospedeira. Durante a tradução, formam-se as poliproteínas (PP) PP1a e PP1ab que são finalmente clivadas pelas proteases virais, protease tipo papaína (PL^{PRO}) e protease tipo 3C (3CL^{PRO}) para criar Proteínas Não Estruturais (NSPs) funcionais. O RNA genômico do coronavírus codifica dois tipos de proteínas, NSPs cruciais para a síntese de RNA viral e proteínas estruturais necessárias para a montagem do vírion (MASTERS, 2006); (SUN *et al.*, 2012).

Após a tradução de proteínas estruturais e NSPs, o Complexo Replicase-Transcriptase (RTC) é formado pela montagem da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (NSP12), helicase (NSP13) e outras subunidades como NSP7 e NSP8. Além disso, o complexo transcreve um modelo de genoma viral de genes de sentido negativo, incluindo genoma de progênie e RNA subgenômico como produtos intermediários, seguido pela transcrição de mRNAs de sentido positivo mediados por RdRp.

Após a transcrição, as proteínas subgenômicas são traduzidas para formar proteínas estruturais e acessórias, como proteínas M, S e E, e encapsuladas no retículo endoplasmático e, em seguida, transportadas para o compartimento intermediário do retículo endoplasmático-Golgi (ERGIC). Em seguida, o genoma viral previamente replicado pode se juntar diretamente à proteína N para formar o nucleocapsídeo que é isolado no ERGIC. Finalmente, os nucleocapsídeos, juntamente com várias outras proteínas estruturais, formam as partículas de vírions em uma forma vesiculada, que é exportada para fora da célula por exocitose para liberar vírions (CHEN; LIU; GUO, 2020).

Figura 2 - Ciclo de vida do SARS-CoV-2



Fonte: (CHAKRAVARTI *et al.*, 2021).

1.4 Variantes

No final de 2020 a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou as variantes como variantes de interesse (VOIs), variantes preocupantes (VOCs) e variantes sob monitoramentos (VUMs) com base em suas características e no risco representado à saúde pública.

As variantes do SARS-CoV-2 têm surgido ao longo do tempo, e algumas delas têm sido motivo de preocupação devido à sua maior transmissibilidade e potencial de escape imunológico. Entre as variantes mais conhecidas e classificadas como preocupantes (VOCs), estão a Alfa, Beta, Gama, Delta e Omicron (ZHOU; ZHU; CHU, 2022) (Tabela 1).

A variante Alfa, encontrada primeiramente no Reino Unido, entre as mutações, a mutação da proteína N501Y desempenha um papel extremamente importante no aumento da afinidade com os receptores ACE-2 e no aumento da adesão viral e da capacidade de entrar nas células hospedeiras (WU *et al.*, 2021).

Beta, inicialmente identificada na África do Sul, apresenta mutações na

proteína *spike*, que é responsável pela entrada do vírus nas células humana, das quais 3 mutações (K417N, E484K e N501Y) estão localizadas no domínio de ligação ao receptor (RBD), aumentando a afinidade de ligação com os receptores ACE-2, resultando em maior risco de transmissão e reduzindo a terapia com anticorpos monoclonais, soros convalescentes e soros pós-vacinação (WIBMER *et al.*, 2021), (MWENDA *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Resumo das variantes de preocupação

Classificação OMS	Linhagem	Nº de mutações	Mutações na proteína Spike
Alfa	B.1.1.7	9	H69_V70 e Y1444 deleção N501Y; A570D; D614G; P681H; T716I; S982A; D1118H
Beta	B.1.351	8	L242_L244 deleção; D80A D215G; K417N; E484K; N501Y D614G; A701V
Gama	P.1	12	L18F; T20N; P26S; D138Y R190S; K417T; E484K; N501Y D614G; H655Y; T1027I; V1176F
Delta	B.1.617.2	9	E156_F157 deleção; T19R G142D; R158G; L452R; T478K D614G; P681R; D950N
Omicron	BA.1	34	H69_V70; V143_Y145; N211 deleção. R214_insEPE; A67V T95I; G142D; L212I; G339D S371L; S373P; S375F; K417N N440K; G446S; S477N; T478K E484A; Q493R; G496S; Q498R N501Y; Y505H; T547K; D614G H655Y; N679K; P681H; N764K D796Y; N856K; Q954H; N969K L981F
	BA.1.1	35	H69_V70; V143_Y145; N211 deleção. R214_insEPE; A67V T95I; G142D; L212I; G339D R346K; S371L; S373P; S375F K417N; N440K; G446S; S477N T478K; E484A; Q493R; G496S; Q498R; N501Y; Y505H; T547K D614G; H655Y; N679K; P681H N764K; D796Y; N856K; Q954H N969K; L981F.

BA.2	28	L24_A27delinsS; T19I; G142D V213G; G339D; S371F; S373P S375F; T376A; D405N; R408S; K417N; N440K; S477N; T478K; E484A; Q493R; Q498R; N501Y; Y505H; D614G; H655Y; N679K; P681H; N764K; D796Y; Q954H; N969K;
------	----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Fonte: Adaptado de (ZHOU; ZHU; CHU, 2022).

Já a variante gama, identificada no Brasil, também possui mutações na proteína spike, com três mutações (N501Y, K417T e E484K) localizadas no RBD, semelhantes à variante Beta. Segundo o estudo do Reino Unido, a variante Gama é cerca de 1,7 a 2,4 vezes mais transmissível (WANG *et al.*, 2021).

A variante Delta, identificada na Índia, conhecida por sua alta transmissibilidade e responsável pela causa de uma segunda onda de infecções mortais por COVID-19 na Índia. Delta tem uma capacidade de replicação maior do que Alpha, e a mutação da proteína spike de P861R no local de clivagem de Furin torna a variante Delta mais fácil de replicar e, portanto, tem uma transmissão mais forte, aumentando o risco de hospitalização e reduzindo a atividade neutralizante (LIU; ROCKLÖV, 2021).

Por fim, a variante omicron, identificada pela primeira vez na África do Sul, tem chamado a atenção devido ao grande número de mutações em sua proteína spike, o que pode aumentar sua capacidade de infectar células humanas. A variante Omicron apresenta enorme potencial de escape imune e transmissibilidade. Seis dessas mutações (G339D, N440K, S477N, T478K, Q498R e N501Y) aumentam a afinidade de ligação ao receptor hACE-2 humano, enquanto sete mutações (K417N, G446S, E484A, Q493R, G496S, Q498R e N501Y) são associados a uma redução na neutralização (WILLETT *et al.*, 2022).

1.5 iodiversidade Brasileira

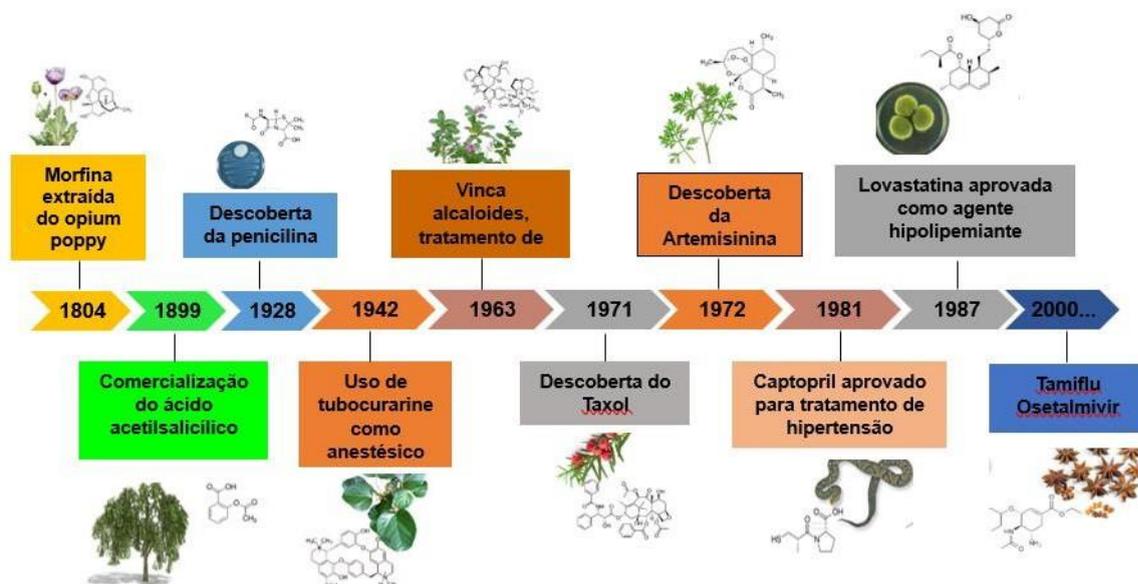
Os produtos naturais possuem uma longa história e são comumente usados no mundo com a perspectiva de descobrir novas moléculas bioativas, processo conhecido como bioprospecção. As moléculas candidatas, estudadas em

modelos de screening, e subsequentemente, em técnicas analíticas, identificam potenciais ações biológicas, a exemplo do câncer e doenças infecciosas (MARQUES *et al.*, 2022).

A biodiversidade tem sido a base para o desenvolvimento e crescimento da nossa sociedade. Espécies vegetais, foram essenciais para a sobrevivência humana, principalmente aquelas com uso medicinal. Populações antigas ao redor do planeta estabeleceram um conjunto de espécies vegetais úteis. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o uso da medicina tradicional está crescendo nos países desenvolvidos como uso complementar e chega a 80% na África, que depende essencialmente das plantas para cuidados primários de saúde (VALLI; BOLZANI, 2019).

Considerando a diversidade química e biológica presente no Brasil, existe oportunidades para inovação de base biológica. Existem alguns produtos naturais brasileiros que foram utilizados com sucesso para desenvolver novos produtos e evidenciar o potencial da biodiversidade do país. A biodiversidade brasileira é, sem dúvida, vasta. No entanto, poucos produtos surgiram desse rico universo químico. (VALLI; BOLZANI, 2019).

Figura 3 - Produtos naturais utilizados como medicamentos identificados no século passado



Fonte: Adaptado de (VALLI; BOLZANI, 2019).

A população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças agudas e crônicas. Isso tem chamado a atenção de pesquisadores brasileiros e de algumas indústrias farmacêuticas brasileiras para o estudo de plantas medicinais nativas e seus princípios ativos. Mais recentemente, o uso de novas tecnologias, como abordagens proteômicas e genômicas, levou a um interesse recorrente em produtos naturais tanto da academia quanto de empresas farmacêuticas (DUTRA *et al.*, 2016).

1.6 Produtos Naturais

Diante desse cenário desafiador, a busca por alternativas terapêuticas eficazes se torna ainda mais urgente, nesse contexto, compostos naturais têm despertado interesse como possíveis agentes antivirais contra o SARS-CoV-2 e suas variantes. Estudos têm demonstrado que algumas substâncias presentes em plantas medicinais, como flavonoides e polifenóis, apresentam atividade antiviral *in vitro* contra o SARS-CoV-2.

Produtos naturais podem inibir diretamente patógenos relacionados a doenças que infectam o trato respiratório ou estruturam atividades do sistema imunológico para prevenir ou aliviar infecção (YAN *et al.*, 2021). Essas pesquisas passam por um longo processo de desenvolvimento desde a formulação inicial até o isolamento e extração de compostos com propriedades terapêuticas. Mesmo durante a pandemia de COVID-19, pesquisas foram conduzidas visando identificar possíveis moléculas/compostos com capacidade de prevenir e ou tratar a doença, estudando os efeitos farmacológicos de sementes de cominho preto por meio da extração de seus compostos bioativos (ISLAM *et al.*, 2021).

Desde sua descoberta em 1922 por Evans e Bishop, o alfa-tocoferol aparece como um importante agente de prevenção e tratamento de doenças inflamatórias, imunológicas e neurodegenerativas, e por outro lado, não há pesquisas investigando como um possível agente antiviral (SZYMAŃSKA; NOWICKA; KRUK, 2017).

Os flavonoides são conhecidos e indicados em medicamentos tradicionais e modernos no tratamento de várias doenças, como proteção contra o câncer (câncer de pele e glioblastoma) e prevenção da osteoporose, incluindo infecções virais (AGRAWAL; AGRAWAL; BLUNDEN, 2020). As atividades imunomoduladoras e anti-inflamatórias de citocinas foram descritas por (ALZAABI *et al.*, 2022), além de mostrar

a capacidade dos flavonoides em reduzir o agravamento do COVID-19 em caso de obesidade por meio do metabolismo de lipídeos.

Caempferol é um flavonoide natural derivado principalmente do rizoma da família do gengibre e presente em diferentes espécies vegetais. Tem recebido ampla atenção por causa de seus efeitos anticancerígenos. Caempferol induziu piroptose através da regulação da autofagia em células, tendo mostrado no estudo boa atividade antiglioma por induzir ROS (CHEN *et al.*, 2020). Estudos também relataram atividades anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e antiviral, contra o pseudoraiwa (PRV) (LI *et al.*, 2021). No extrato das folhas de *Vitis vinífera* caempferol mostrou relevância contra dois vírus humanos: *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) e (SARS-CoV-2), inibindo a replicação viral nos estágios iniciais, bloqueando diretamente as proteínas na superfície viral (ZANNELLA *et al.*, 2021).

Alfa-Bisabolol é um dos importantes sesquiterpenos monocíclicos, derivado naturalmente de óleos essenciais de muitas plantas comestíveis. Foi obtido pela primeira vez a partir de *Matricaria chamomilla*, comumente conhecida como camomila ou camomila alemã. A literatura disponível indica que esta planta, juntamente com outras plantas contendo alfa-Bisabolol, é popularmente utilizada na medicina tradicional por potenciais benefícios à saúde. Estudos experimentais demonstraram propriedades farmacológicas do alfa-Bisabolol, incluindo anticâncer, antinociceptivo, neuroprotetor, cardioprotetor e antimicrobiano (EDDIN *et al.*, 2022).

Mesmo com medicamentos aprovados pela Food and Drugs Administration (FDA) como: Remdesivir, Sotrovimabe, Baricitinibe, Paxlovid e Monupiravir, ainda há restrição na aplicação em pacientes e alguns estão disponíveis apenas para uso hospitalar (PACL *et al.*, 2021), além do custo elevado, por exemplo, Paxlovid, fabricado pela Pfizer, custa em média R\$4.876,83. Nessa perspectiva, estratégias de identificação de novas moléculas antivirais vêm sendo consideradas relevantes para a identificação de novos fármacos terapêuticos.

Esses compostos naturais podem atuar em diferentes etapas do ciclo de replicação viral, como a entrada do vírus nas células, a replicação do seu material genético e a montagem de novas partículas virais. Além disso, eles podem ajudar a modular a resposta imune do hospedeiro, contribuindo para o controle da infecção. É importante ressaltar que a atividade antiviral *in vitro* não garante a eficácia desses compostos no tratamento de pacientes infectados.

No entanto, eles representam uma esperança na busca por alternativas terapêuticas, especialmente em locais onde o acesso a medicamentos antivirais é limitado.

2 JUSTIFICATIVA

Consideradas a relevância da pandemia instalada; o impacto da doença sobre o Sistema de Único de Saúde – SUS; a necessidade de estratégias de enfrentamento para COVID-19; a restrição de medicamentos aprovados para pacientes; a identificação de potenciais proteínas do SARS-CoV-2 como potenciais alvos para fármacos, e a biodiversidade brasileira como fonte de moléculas ativas, este trabalho visou: a) contribuir com a identificação de moléculas capazes de inibir o SARS-CoV-2, b) identificar por estudos *in silico* a interação dos compostos contra a proteína S, M^{PRO}, RdRp.

A identificação de moléculas candidatas auxiliará no desenvolvimento de potenciais medicamentos eficazes e seletivos, oriundos da bioprospecção das moléculas chaves para auxiliar na terapêutica e tratamento da COVID-19, visando reduzir a dependência do país em insumos para a saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar produtos com potencial atividade antiviral, a partir de produtos naturais contra o SARS-CoV-2, para o tratamento da COVID-19.

3.2 Objetivos Específicos

- a) 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;
- b) Determinar o potencial citotóxico e de neutralização antiviral *in vitro* para moléculas selecionadas.
- c) Determinar a concentração inibitória IC50 para molécula com maior potencial de neutralização.
- d) Determinar o grau de afinidade de moléculas baseadas nas estruturas das substâncias de elevado potencial de ação contra o SARS-CoV-2, a partir das análises realizadas pelo protocolo *in silico*, tendo como alvos as proteínas S, M^{PRO} e RdRp.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das moléculas

A biblioteca química constituída de banco virtual de moléculas da Biodiversidade Brasileira (Tropical DB/Embrapa Agroindústria Tropical - CNPAT) (<https://www.embrapa.br/agroindustria-tropical>); elaborada a partir de moléculas extraídas de plantas dos diferentes Biomas Brasileiros foi utilizada para os ensaios de busca de moléculas candidatas.

A seleção das moléculas teve como princípio norteador resultados prévios do grupo de pesquisa, assim como relatos científicos publicados sobre potenciais classes de compostos com atividade antiviral.

Tendo como referência a ocorrência natural em espécies depositadas na Tropical DB, foram selecionadas o alfa-tocoferol, caempferol e o alfa-bisabolol para avaliar a potencial atividade antiviral contra o SARS-CoV-2. As moléculas utilizadas foram adquiridas comercialmente (SIGMA), como forma de assegurar o efeito individual de cada molécula.

Cultura de células Vero

Células da linhagem Vero foram cultivadas em meio L-15 com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina. A manutenção é realizada até atingir a confluência de 75%. Todo o protocolo de cultivo e manutenção das células seguiu as recomendações do fabricante.

4.2 Teste de Citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-di-fenil brometo de tetrazolium)

A redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar como produto o azul de Formazan é utilizada como referência. O ensaio mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida, e ao número de células viáveis em cultura.

A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio com MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolium]} (Life Technologies, USA). Células da linhagem Vero foram diluídas para a concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio

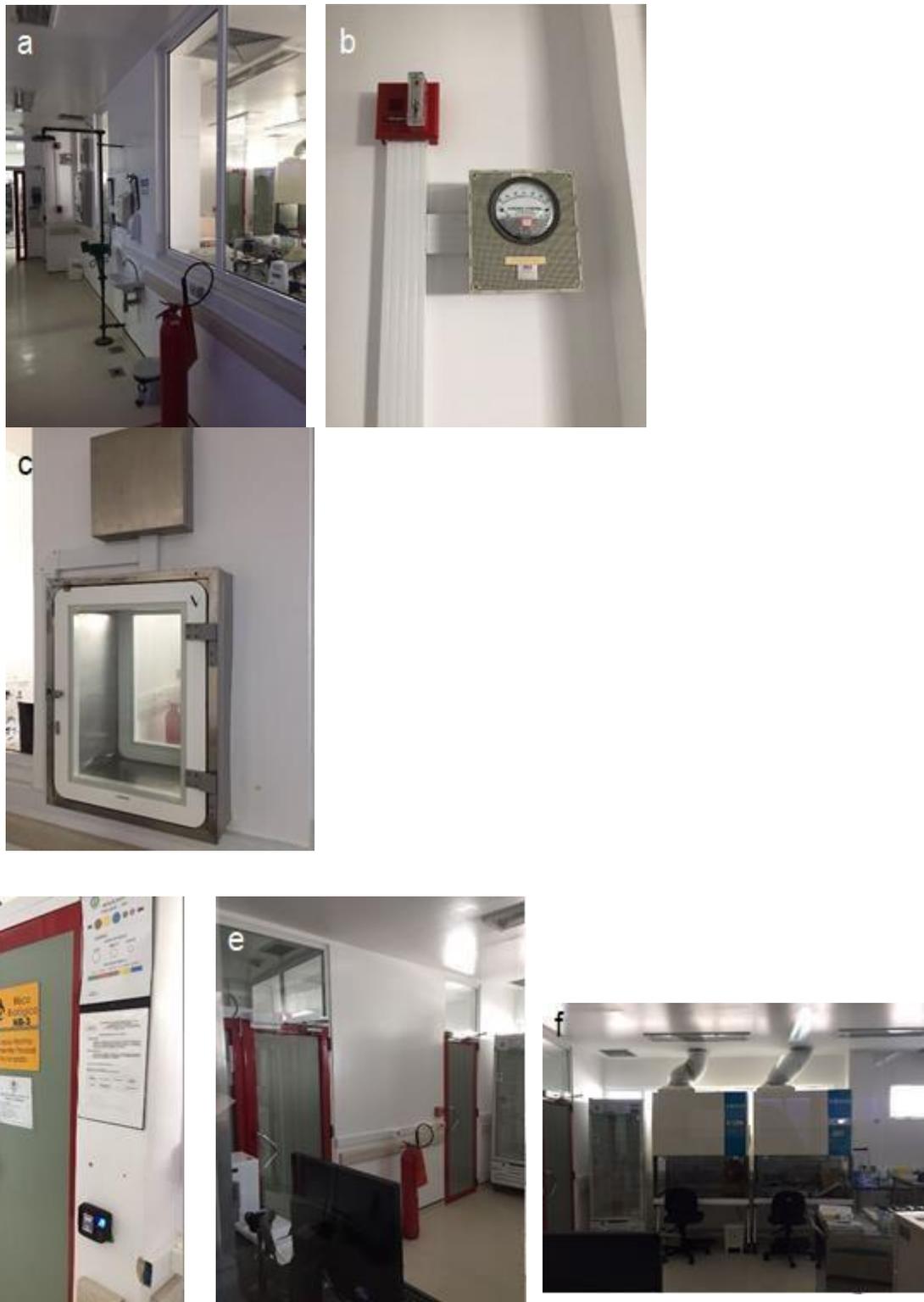
Leibovitz L-15 (Cultilab, Brasil) com 2% soro fetal bovino (SFB). Em seguida, 100 µL dessa solução foram adicionadas em placas de 96 poços. Após o período de 24 horas de incubação em estufa de CO₂ a 37°C (Panasonic, MCO- 18AC, USA& Canadá), o meio foi removido e acrescentada as soluções das substâncias em quadruplicata na concentração inicial de 10 µM em meio Leibovitz L-15 com 2% SFB. Foi feita uma diluição logarítmica de $-\log_2$ de 10 diluições. Os poços controle não receberam as substâncias selecionadas.

As células foram incubadas com as moléculas selecionadas, em diferentes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,562 e 0,781 mg/mL, 24 a 48 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período, o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com 200 µL de PBS 7,4 e acrescentado 20 µL de MTT (5 mg/mL). A placa permaneceu por 4 horas na estufa de 5% CO₂ a 37°C. Em seguida, o MTT foi removido e os cristais de formazan diluídos com 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi lida a 570 nm no leitor de placas (Micronal B542). A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula: $VC\% = DO(a)/DO(c) * 100$. Para determinação da Concentração Citotóxica em 50% (CC50) foi realizada a equação de regressão linear a partir dos resultados de concentração e viabilidade celular, considerando o modelo de equação: $y = a + bx$ (MOSMANN, 1983).

4.3 Local da Experimentação

Toda a manipulação do vírus SARS-CoV-2 foi realizada no laboratório de nível de biossegurança III (NB3) do LACEN em Fortaleza, Ceará. Abaixo, fotos do laboratório NB3 onde foram realizadas as atividades relacionadas a manipulação do vírus SARS-CoV-2.

Figura 4 - Infraestrutura do laboratório NB3, LACEN-CE. a) Corredor de acesso ao NB3; b) Medidor de pressão; c) *Pass Through*; d) Porta de acesso; e) Portas de entrada e saída; e f) interior do NB3



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Obtenção do SARS-CoV-2

O vírus foi obtido de um esfregaço nasofaríngeo coletado de um paciente do Hemoce que foi submetido ao diagnóstico de Covid-19, conforme descrito (HOLSHUE *et al.*, 2020). O esfregaço nasofaríngeo foi coletado no início dos sintomas e colocado em 2–3 mL de meio de transporte viral usado para diagnóstico molecular. A amostra foi testada para SARS-CoV-2 por RT-PCR no Hemoce, alíquotada e congelada a -20° C até o isolamento do vírus. As atividades de pesquisa foram submetidas ao Comitê de Ética em Pesquisa.

4.5 Isolamento Viral

O isolamento viral ocorreu 11 dias após a coleta da amostra. Todo o processo de isolamento foi realizado dentro do Laboratório Central do Estado do Ceará – LACEN, nível de biossegurança III. Durante o período de infecção e replicação viral foram realizadas duas coletas (200 µL) do sobrenadante, uma no dia 5 e outra no dia 7 após a infecção, para verificar a multiplicação do vírus por RT-PCR por tempo real. Foi possível verificar uma redução do ct da amostra coletada no dia 7 em comparação com a amostra do dia 5. Dessa forma podemos verificar que o vírus se replicou nas células Vero E6 devido ao aumento dos genes no sobrenadante do cultivo celular detectados por RT-PCR em tempo real.

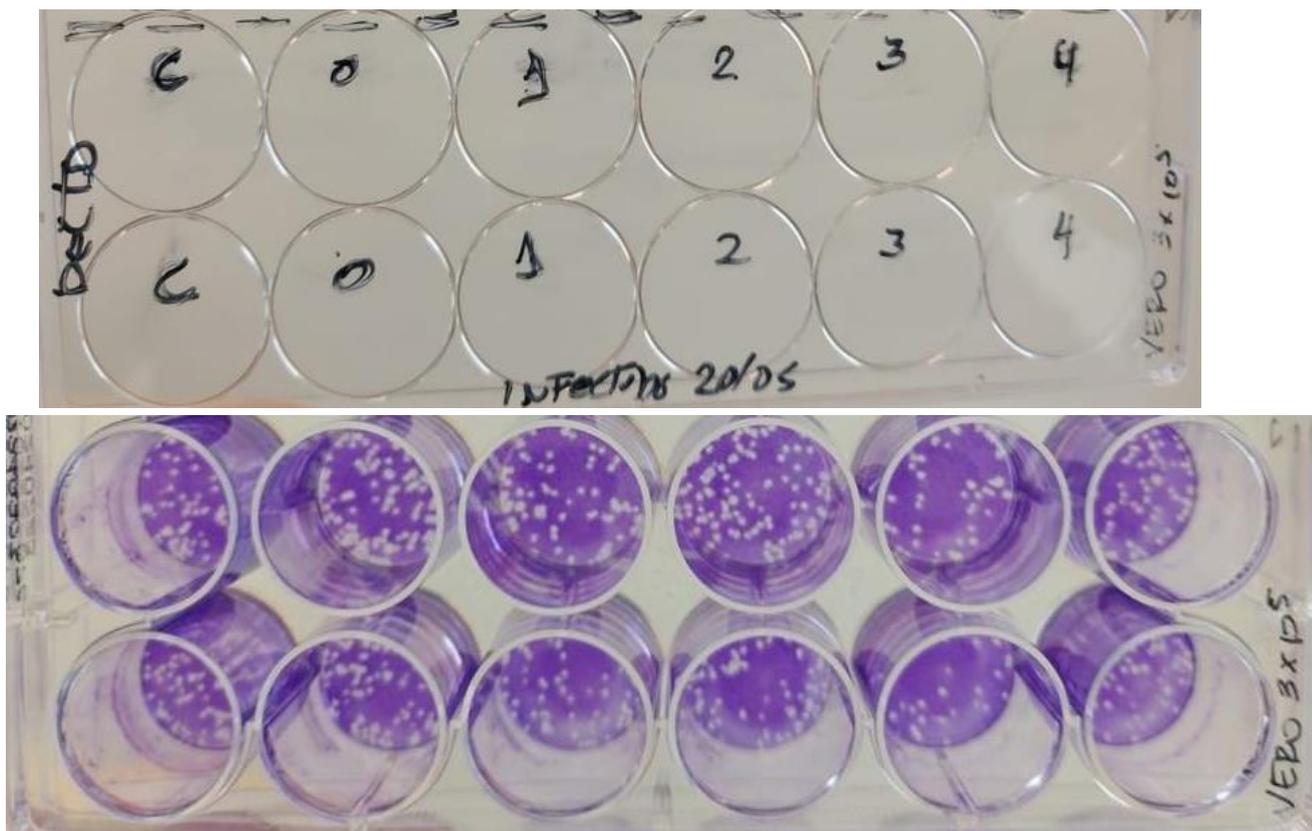
4.6 Titulação Viral - PFU - “*Plaque formation units*” e Identificação da variante

A concentração de vírus viáveis foi verificada pela técnica de PFU - “*Plaque formation units*” utilizando o protocolo descrito previamente por (MENDOZA *et al.*, 2020). O sobrenadante do cultivo celular foi coletado 7 dias após a infecção com a amostra clínica, alíquotado em criotubos e armazenado a -80° C. Uma semana depois do congelamento, uma amostra foi descongelada em banho- maria a 37° C e titulada pela técnica e PFU. Células Vero E6 foram cultivadas em placas de 12 poços e incubadas a 37°C em meio de cultura L-15 com 2% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (GIBCO). Após atingirem uma confluência de 90-100%, as células foram lavadas com PBS pH 7,3 e uma alíquota do vírus foi

descongelada e diluída de forma seriada (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) em meio L-15 sem soro fetal bovino. 250 μ L de cada diluição foi adicionada em duplicata nos poços e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C homogeneizando a cada 15 minutos. Em seguida, as soluções dos poços foram removidas e adicionado 1 ml do *overlay* contendo 1,0% de carboximetilcelulose em L-15 contendo 2% de FBS e 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (GIBCO). Após 72 horas de incubação a 37 °C, 1 ml de formaldeído a 3,65% em PBS foi adicionado nos poços e decorrido o tempo de 1 hora, a mistura foi removida e as células coradas com 0,5% cristal violeta por 5 a 15 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas com água corrente, digitalizadas e analisadas utilizando o programa ImageJ®.

A titulação do vírus foi realizada contando-se as placas formadas em uma das diluições utilizando-se a fórmula: PFU = média de placas /D x V (D= diluição e V= volume de vírus adicionado à placa). O vírus apresentou uma titulação de $4,04 \times 10^5$ PFU/mL do SARS-CoV-2.

Figura 5 - PRNT da titulação do SARS-CoV-2 nas diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^5 , respectivamente, da esquerda para a direita



Fonte: Elaborado pela autora.

4.7 Determinação da Variante Viral

Para se determinar a variante, um segundo criotubo foi encaminhado para o sequenciamento realizado pelo Grupo de Vigilância Genômica da Fiocruz-CE, no qual foi identificado como sendo da variante VOC Delta AY.99.2, utilizando o kit CovidSeq™.

4.8 Teste de Neutralização Viral PRNT

Para determinar a capacidade inibitória das moléculas na replicação do SARS-Cov-2 *in vitro* foi realizado a técnica de PRNT – “*Plaque reduction neutralization test*” como descrito por Bewley *et al*, (2021) com pequenas modificações.

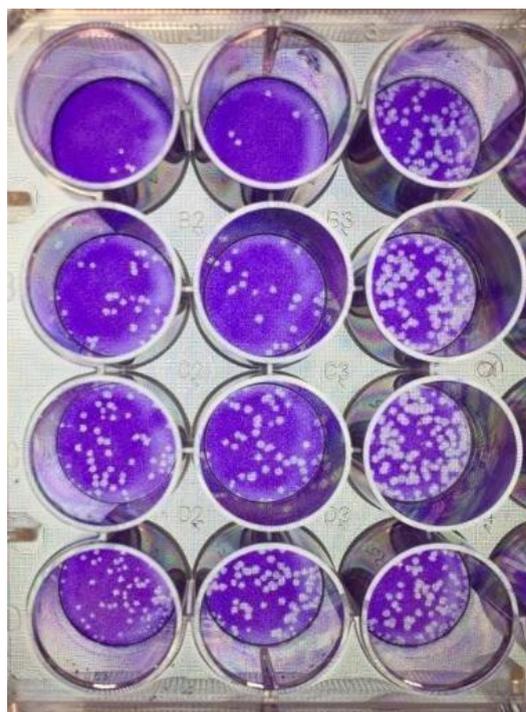
Células Vero E6 ATCC foram plaqueadas (500µL/poço) na concentração de 3×10^5 /mL em placas de 24 poços usando meio Leibovitz (L-15) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) um dia antes do ensaio. As amostras foram diluídas na maior concentração correspondente a concentração letal de 30% (LC30%) em meio L-15 sem SFB e antibiótico. Em seguida, as moléculas foram misturadas com 60 PFU do vírus SARS-CoV-2, variante delta, e incubadas por 1 hora à 37°C. Decorrido o tempo, 200 µL da mistura molécula/vírus foi adicionada em duplicata à placa de 24 poços e incubada por 1 hora à 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 incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação a cada 15 minutos. Dois poços receberam apenas o vírus como controle positivo.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram removidas da placa e imediatamente acrescentado 500 µL do *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 3,7% por 1 hora. Em seguida, o *overlay* foi removido e as células coradas com cristal de violeta 0,5%. Os poços foram digitalizados e as placas contadas com o auxílio do programa ImageJ®.

A porcentagem de neutralização foi calculada utilizando a fórmula: $PRNT\% = (\text{média da amostra} \times 100 / \text{média do controle}) - 100$. Os testes foram realizados em duplicata em dois experimentos independentes. O IC₅₀ da concentração inibitória foi

calculado apenas para as amostras que apresentaram inibição viral superior a 50%. Para isso, as amostras foram diluídas 5 vezes de forma seriada em meio L-15 sem SFB e antibiótico iniciando na concentração LC30%. A metodologia foi a mesma descrita anteriormente, com exceção que foram realizados três experimentos independentes. O IC₅₀ foi determinado utilizando a equação dose-resposta – inibidor: log (inibidor versus normalização da resposta - variável *slope* do programa GraphPad Prism® 6.01.

Figura 6 - PRNT para determinação do IC₅₀



Fonte: Elaborado pela autora.

4.9 Ancoragem Molecular

Realizou-se simulações de ancoragem molecular com compostos selecionados e três alvos do vírus. As estruturas de proteína 3D de alvos de proteína foram recuperadas do Protein DataBank (BERNMAN *et al.*, 2000).

As proteínas são codificadas como 6VYB para a estrutura de ectodomínio SARS-CoV-2 spike (estado aberto) (Walls., 2020), 6LU7 para a estrutura cristalina da protease principal de COVID-19 em complexo com um inibidor N3 (M^{PRO}) (JIN *et al.*, 2020), 6M71 a RdRp.

A ancoragem molecular na presença de α -tocoferol (CID 2116), caempferol (CID 5280863) e α -bisabolol foram realizados pelo programa DOCTHOR disponível no servidor do Laboratório Nacional de Ciência da Computação (GUEDES *et al.*, 2021). O software Openbabel (O'BOYLE *et al.*, 2011) foi usado para converter os arquivos smile de cada ligante em arquivos no formato PDB para ser usado como entrada para o DockThor.

Os estados de protonação padrão de cada proteína, com base no pH neutro, foram usados, 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 um milhão de avaliações e 24 execuções para cada ligante geraram as poses de encaixe. A previsão de afinidade e a classificação de complexos proteína-ligante são realizadas com o 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 (GUEDES *et al.*, 2021).

O cálculo da afinidade de ligação em diferentes estruturas de ancoragem foi classificado e a ligação proteína-ligante no sítio de ligação foi considerada expressa como sua afinidade de ligação. A força de atração da proteína e do ligante determinou a afinidade de ligação correspondente. Esses valores de afinidade de ligação de diferentes estruturas de ancoragem para cada ligante e cada alvo.

Além disso, o software PyMol (Schrödinger, 2015) e o software LigPlot+ (WALLACE *et al.*, 1995) foram usados 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.

4.10 Análises Estatísticas

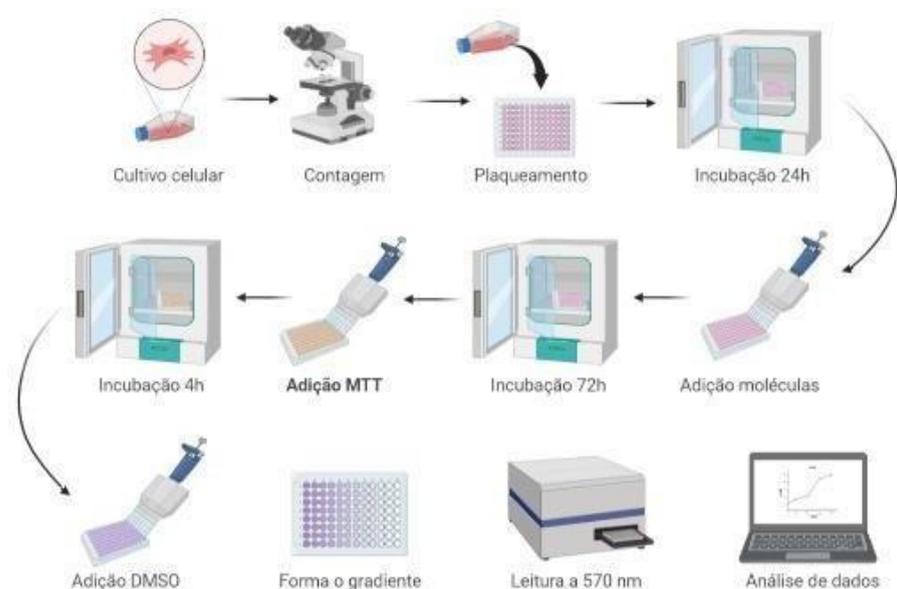
Os resultados foram analisados por comparação de dois experimentos independentes pelo teste "t", One-way ANOVA ($P < 0,05$) utilizando o programa GraphPad Prim® 6.01.

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade das moléculas

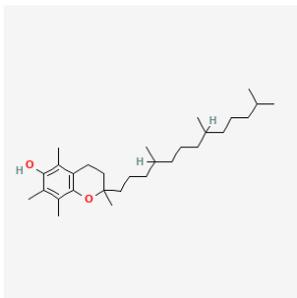
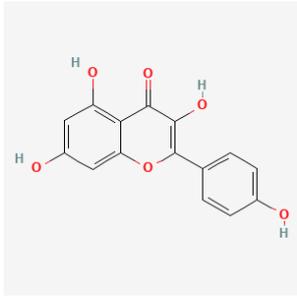
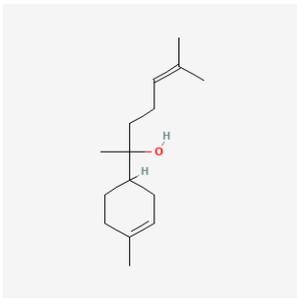
A citotoxicidade das moléculas selecionadas foi determinada nas diferentes concentrações avaliadas. A partir dos resultados obtidos, foram selecionadas as concentrações com valores $\leq 30\%$ em porcentagem de inibição/citotoxicidade, calculados para cada ponto de diluição, em três experimentos independentes realizados em triplicata. As concentrações selecionadas estão apresentadas na Tabela 2.

Figura 7 - Teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolium)



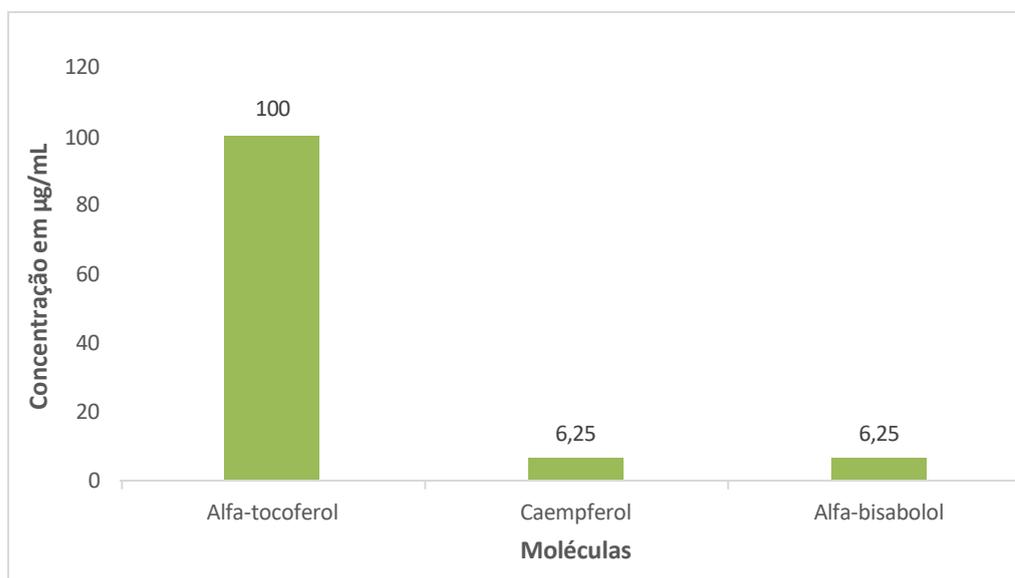
Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Moléculas candidatas de SARS-CoV-2 usadas em bioensaios *in vitro*

Moléculas	PUB Chem Cid	Estrutura	Concentração (µg/mL)
Alfa-tocoferol	2116		100
Caempferol	5280863		6,25
Alfa-bisabolol	10586		6,25

Fonte: Elaborado pela autora.

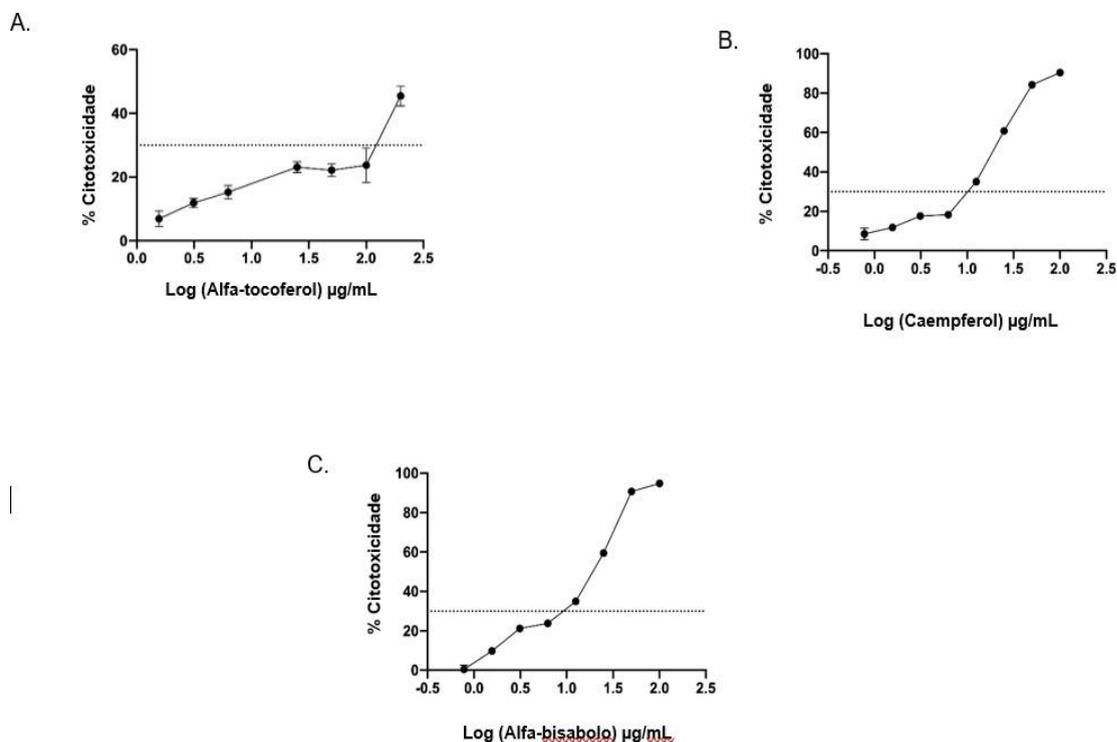
Figura 8 - Gráfico de concentração das moléculas testadas



Fonte: Elaborado pela autora.

A atividade citotóxica do alfa-tocoferol (A), caempferol (B), e alfa-bisabolol (C), em células Vero E6, foram diluídas em concentrações variadas usando o MTT assays, após 72h de tratamento. Os valores expressados em como mean \pm SEM nos últimos três experimentos independentes, cada experimento foi realizado em triplicata. GraphPad Prism 8 foi usado para calcular os resultados.

Figura 9 - Gráficos logarítmico da atividade citotóxica dos compostos: Alfa-tocoferol (A), Caempferol (B) e Alfa-bisabolol (C)

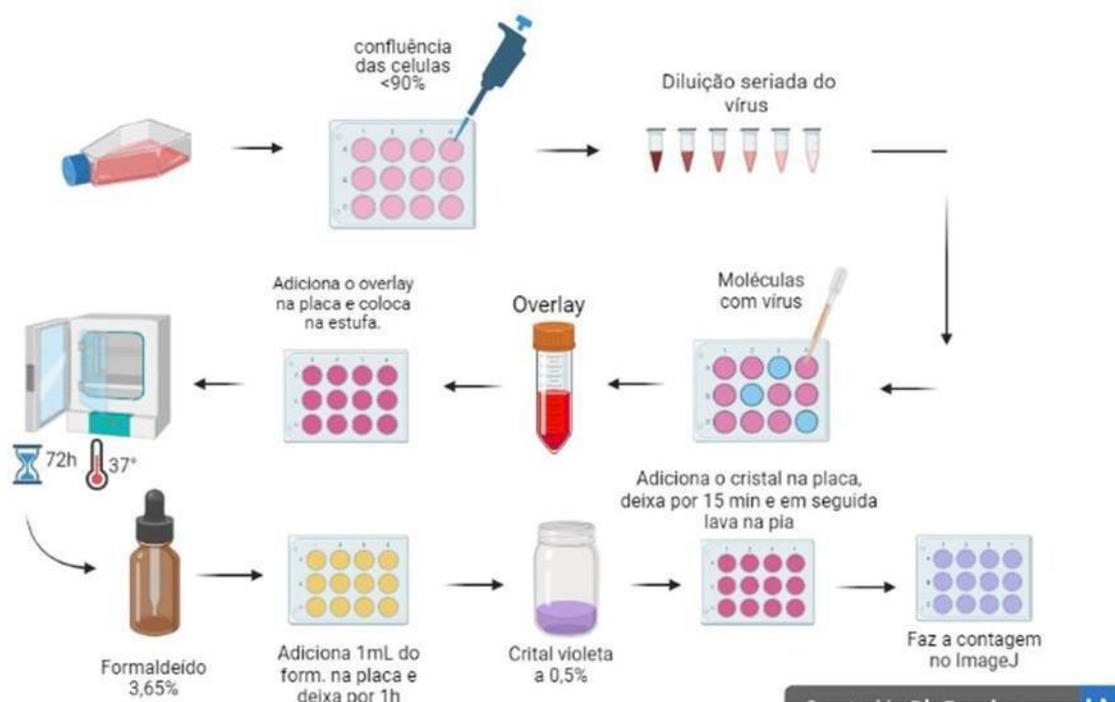


SARS-CoV-2 e PRNT

Fonte: Elaborado pela autora.

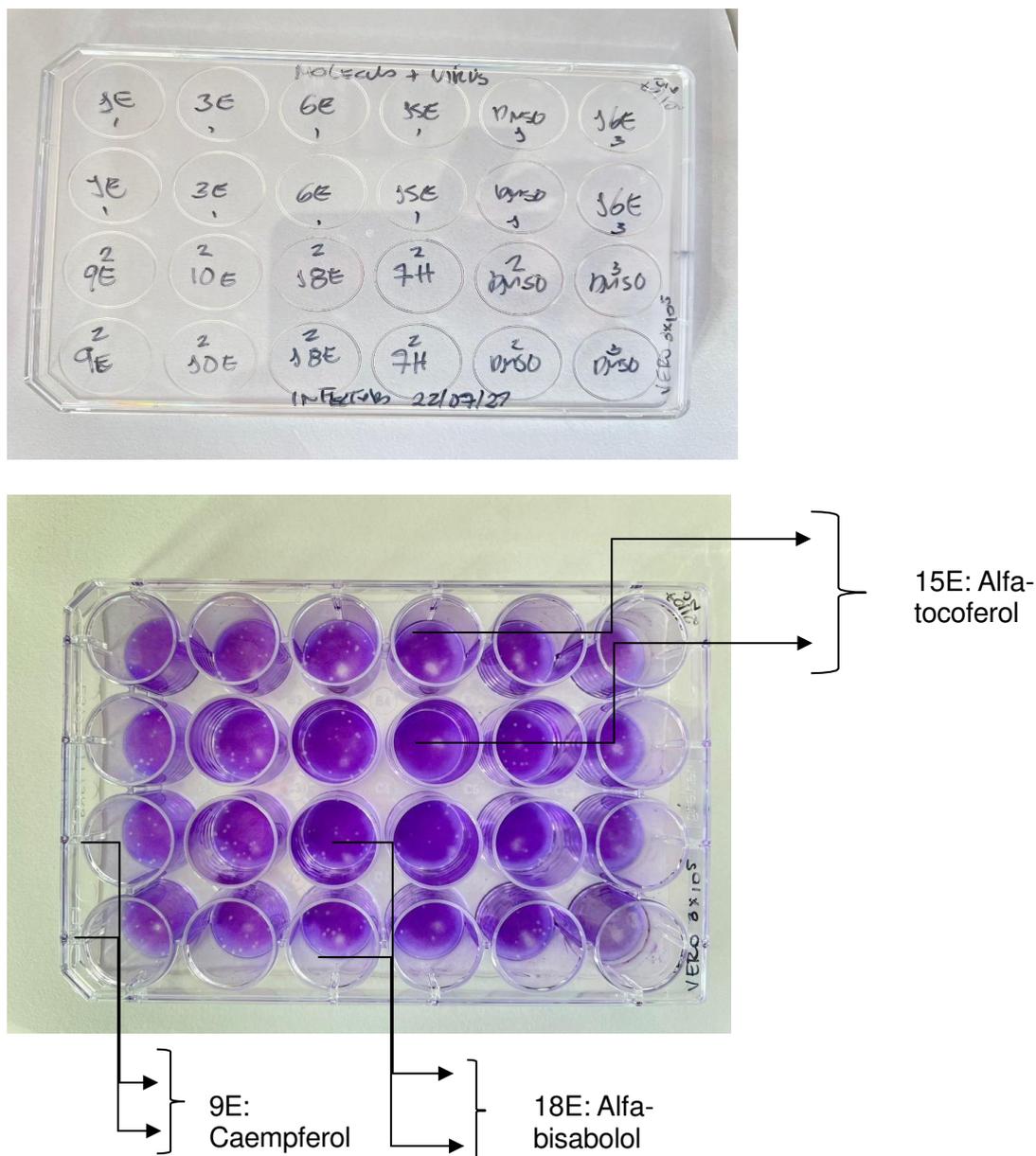
As amostras foram avaliadas quanto à capacidade de neutralizar o SARS-CoV-2, variante Delta, agindo diretamente quando incubadas com as células e posteriormente infectadas. Nenhuma amostra apresentou atividade antiviral quando incubada com a célula (Figura 10).

Figura 10 - Teste PRNT com incubação prévia das moléculas com células VERO



Fonte: Elaborado pela autora.

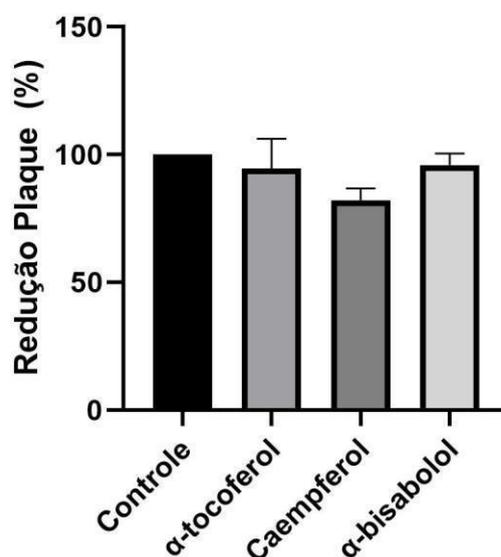
Figura 11 - PRNT para verificar se as moléculas tiveram atividade antiviral



* Teste PRNT de moléculas candidatas incubadas, por 72h, com células VERO (72h). Células Vero E6 ATCC foram plaqueadas (500 μ L/poço) a uma concentração de 3×10^5 mL em placas de 24 poços usando meio Leibovitz (L-15) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina antibiótico um dia antes dos ensaios. Após esse tempo, 200 μ L da mistura molécula/célula foram adicionados à placa de 24 poços e incubados por 1 hora a 37°C. Usamos DMSO como controle negativo. Porcentagem de plaques formados após uma hora de incubação das moléculas com as células.

Fonte: Elaborado pela autora.

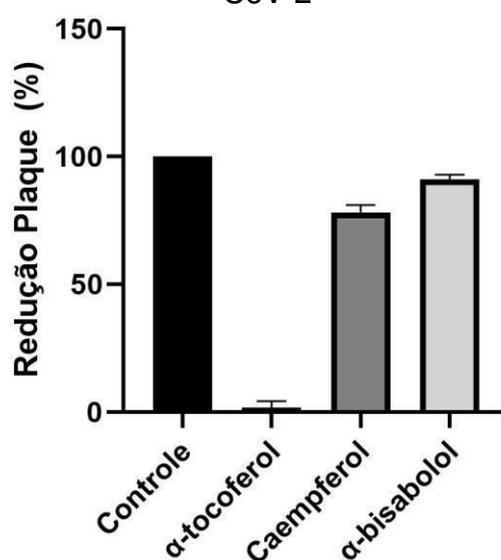
Figura 12 - Gráfico amostra + células



Fonte: Elaborado pela autora.

Porém, quando as amostras foram incubadas diretamente com o vírus, o α-tocoferol apresentou atividade antiviral de 98,2% (Figura 13). As moléculas caempferol e alfa-bisabolol apresentaram 20,8% e 8,8%, respectivamente.

Figura 13 - Gráfico PRNT com incubação das moléculas candidatas com o SARS-CoV-2



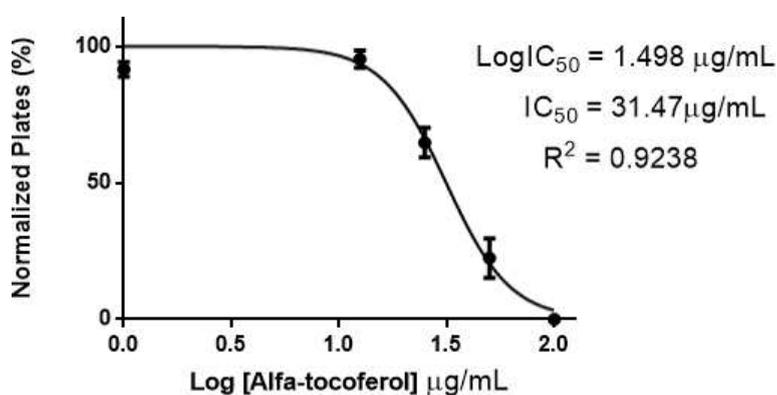
* Células Vero E6 ATCC foram plaqueadas (500 µL/poço) a uma concentração de 3×10^5 mL em placas de 24 poços usando meio Leibovitz (L-15) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/antibiótico estreptomicina um dia antes dos ensaios. Após esse tempo, 200 µL da mistura molécula/vírus foram adicionados à placa de 24 poços e incubados por 1 hora a 37°C. Usamos DMSO como controle negativo. Porcentagem de plaques formados após uma hora de incubação das moléculas com vírus. (*) Diferença significativa pelo teste "t".

Fonte: Elaborado pela autora.

SARS-CoV-2 e PRNT

O alfa-tocoferol inibiu significativamente o vírus Covid-19 quando em contato direto com o vírus. Dessa forma, foi diluído seriadamente e analisado por PRNT para determinar a concentração inibitória do vírus, mostrando IC de 31,47 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico da concentração inibitória IC50



* Log IC₅₀ (concentração inibitória) da amostra de alfa-tocoferol após uma hora de incubação com o vírus da variante Delta SARS-CoV-2.

Fonte: Elaborado pela autora.

Ancoragem molecular

A ancoragem molecular é uma das abordagens mais comuns usadas para triagem virtual e que vai testar todos os ligantes de interesse. De maneira simplificada, o algoritmo simula o posicionamento dos ligantes dentro de seu respectivo sítio de ligação, buscando testar essa interação e calculando as energias de interação do complexo ligante e receptor. Com o objetivo de obter os compostos com maior atividade biológica em potencial, a técnica é bem conhecida no desenvolvimento de inúmeros medicamentos, porém é preferencialmente utilizada quando a estrutura do alvo é conhecida por cristalografia de raios-X ou predita por modelagem de homologia.

Neste estudo usamos três principais alvos de proteínas em interação com os três compostos orgânicos. A Tabela 3 mostra a energia total de ligação dos ligantes e alvos moleculares e mostra o alfa-tocoferol como o antiviral de maior energia de interação. Considerando as características de cada alvo, observamos que a energia

total varia de -6,836 Kcal/mol a -8,772 Kcal/mol, principalmente devido às diferentes interações entre o ligante e os alvos potenciais.

Para M^{PRO}, que é a principal protease para processamento de poliproteínas, o sítio de ligação está em uma cavidade formada pelas cadeias laterais dos resíduos Gln189, Met49, Pro168, Glu166 e His41 e o sítio ativo é formado pelos resíduos Cys145 e His41 (Jin *et al.*, 2020, Bharadwaj *et al.*, 2021). A ancoragem molecular revelou que o melhor valor de energia de ligação com a SARS-CoV-2 M^{PRO} foi o α -tocoferol (Energia Total = -7,48 Kcal/mol), seguido por Kaempferol (-6,916 Kcal/mol) e α bisabolol (-6,836 Kcal/mol). O α -tocoferol ocupa o sítio de ligação do substrato interagindo com os resíduos Gln189, Glu 166, His41 e Cys 145 mostrando ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Figura 12). Além disso, os resíduos Gln192, His164 e Met165 também interagem com o alfa-tocoferol por meio de interações hidrofóbicas. A mesma classificação foi observada para a ancoragem molecular dos três compostos com SARS-CoV-2 RdRp mostrando uma energia total de -7,948 Kcal/mol, -7,170 Kcal/mol e -6,909 Kcal/mol, respectivamente. A energia de ligação e as interações do α -tocoferol são mostradas na Figura 16. A estrutura do componente chave, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) mostra o sítio ativo formado pelos motivos de polimerase conservados A a G no domínio da palma (GAO *et al.*, 2020). A simulação de ancoragem de alfa-tocoferol mostra principalmente interações hidrofóbicas no complexo formado com as cadeias laterais dos resíduos Tyr561, Asp560, Glu109, Tyr400, Val 108, Lys563, Asp565, Cys564 e uma ligação de hidrogênio com Asp702.

O alvo antivírus mais estudado é a glicoproteína spike, proteína responsável pela entrada dos coronavírus, por isso é um alvo antiviral atraente. A proteína Spike é um complexo homotrimérico que se projeta da superfície viral, formando duas subunidades funcionais, incluindo as subunidades S1 e S2, uma é o domínio N-terminal (NTD) e a segunda é o domínio de ligação ao receptor (RBD) (WANG *et al.*, 2020). A simulação da ancoragem molecular mostrou que o α -tocoferol, seguido pelo kaempferol e α -bisabolol se ligam na cavidade da proteína com energia de afinidade favoráveis de forma significativa, principalmente devido a interações hidrofóbicas (Figura 14). A cavidade é uma bolsa cercada pelos resíduos Pro565, Leu95, Val209, Asn210, Leu91, Lys94, Glu208 e Glu564. Nossos resultados mostram interações hidrofóbicas no complexo de alfa-tocoferol com os resíduos Lys209, Thr615, Gly616, Arg612 e Thr220 das cadeias A e C, mostrando o acoplamento mais

forte com a interface entre subunidades da proteína spike SARS-CoV-2.

Em complexos de simulação de ancoragem molecular, várias interações desempenham um papel importante na estabilidade do ligante no bolso de ligação, como interações eletrostáticas, interações de van der Waals, pontes salinas, ligações de hidrogênio e complexo de interações metálicas. De acordo com nossos dados de simulação molecular foi possível prever que, dentre os compostos orgânicos triados, o α -tocoferol apresentou uma energia total concordante com um potencial inibidor de vírus com triplo modo de ação M^{PRO}, RdRp e Spike.

Tabela 3 - Simulação de ancoragem nos ligantes dos alvos RdRp, Spike e M^{PRO}.

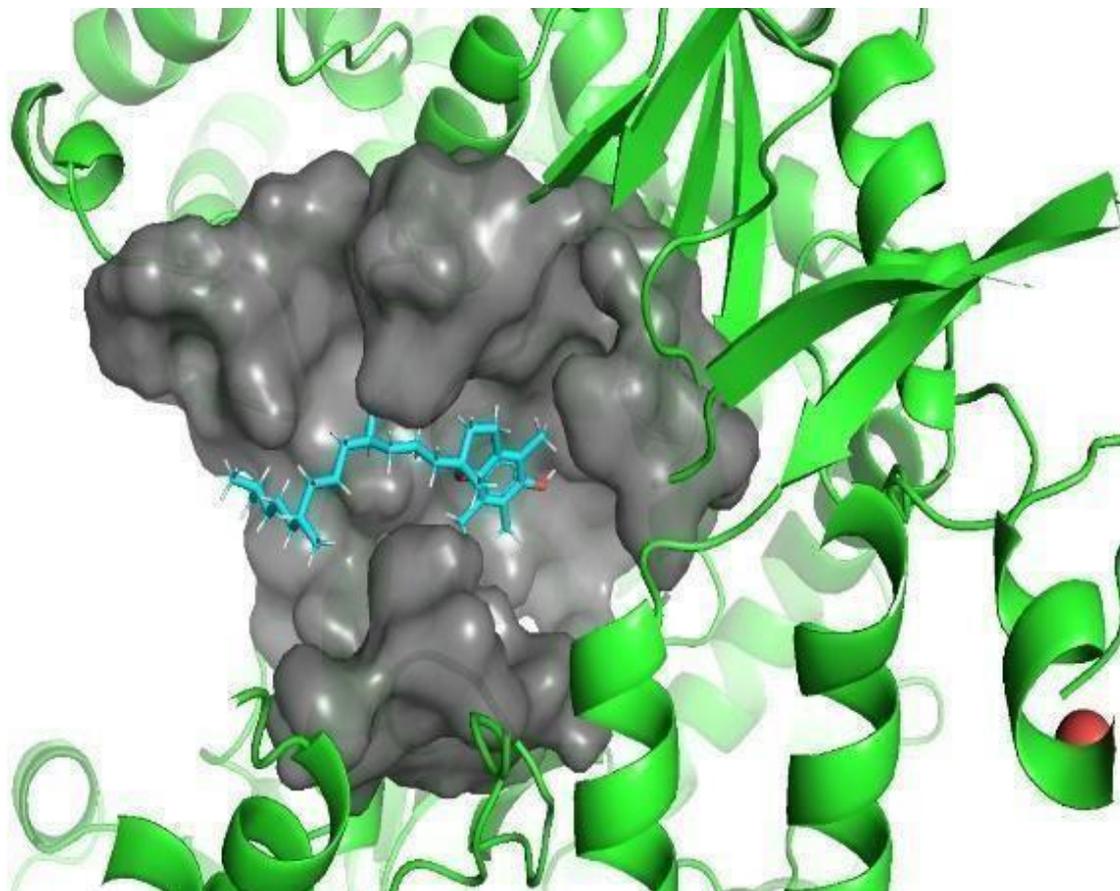
Moléculas	Score	T. Energia	I.Energia	vdW Energia	E.Energia
RdRp					
<i>Alfa-tocoferol</i>	-7.948	26.985	-33.876	-22.12	-11.756
<i>Caempferol</i>	-7.17	11.431	-35.783	-15.912	-19.871
<i>Alfa-bisabolol</i>	-6.909	11.997	-23.33	-13.44	-9.89
Spike					
<i>Alfa-tocoferol</i>	-8.772	24.038	-37.195	-25.560	-11.635
<i>Caempferol</i>	-7.176	13.472	-33.258	-13.904	-19.354
<i>Alfa-bisabolol</i>	-7.358	10.456	-24.759	-18.024	-6.735
M^{PRO}					
<i>Alfa-tocoferol</i>	-7.480	34.184	-26.487	-23.934	-2.553
<i>Caempferol</i>	-6.836	15.390	-29.573	-5.575	-23.848
<i>Alfa-bisabolol</i>	-6.916	13.239	-28.668	-5.734	-12.777

* T. Energia (energia total), I. Energia (energia de interação), E. vdW (energia de van der Waals) e E. Energia (energia eletrostática). A energia é dada em unidades kcal/mol.

Fonte: Elaborado pela autora.

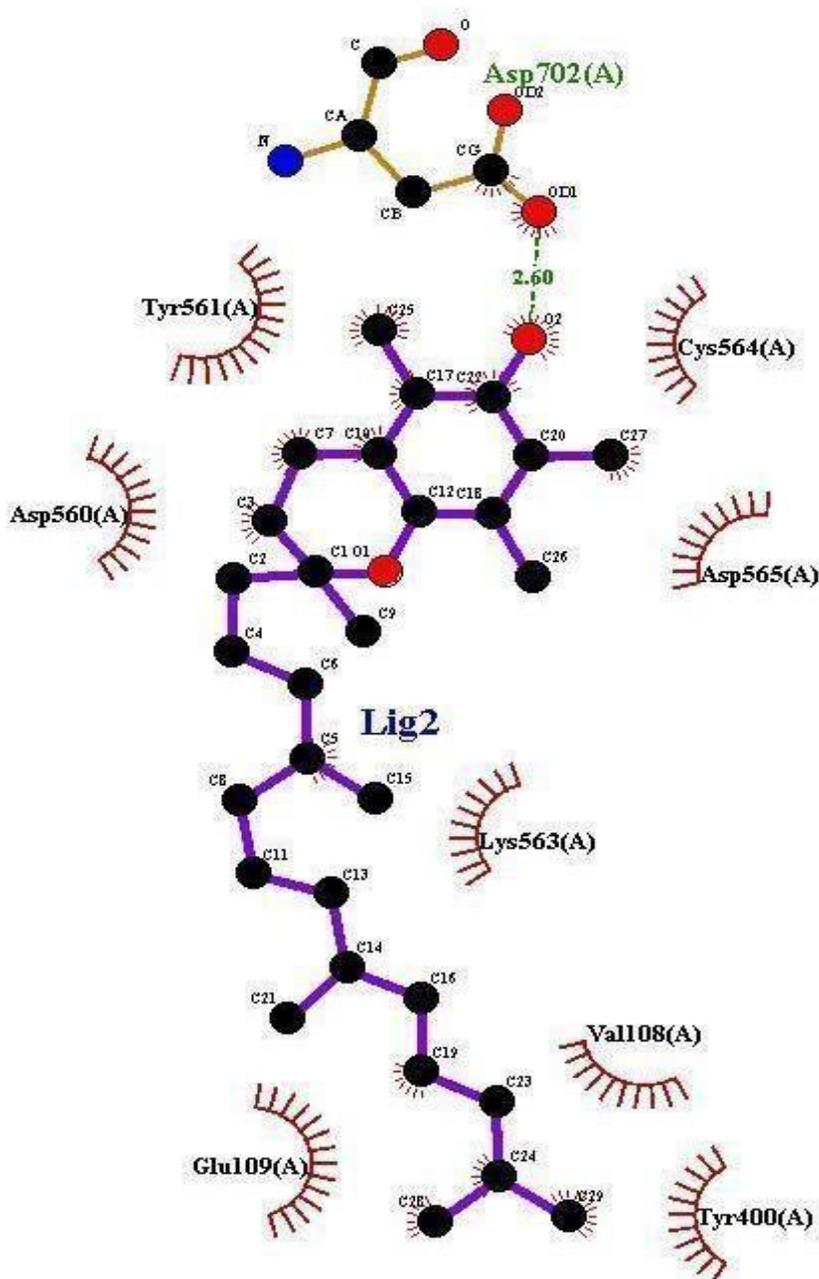
Figura 15 - Ancoragem molecular do alfa-tocoferol contra a Proteína RdRp

For: Educational Use 0/19



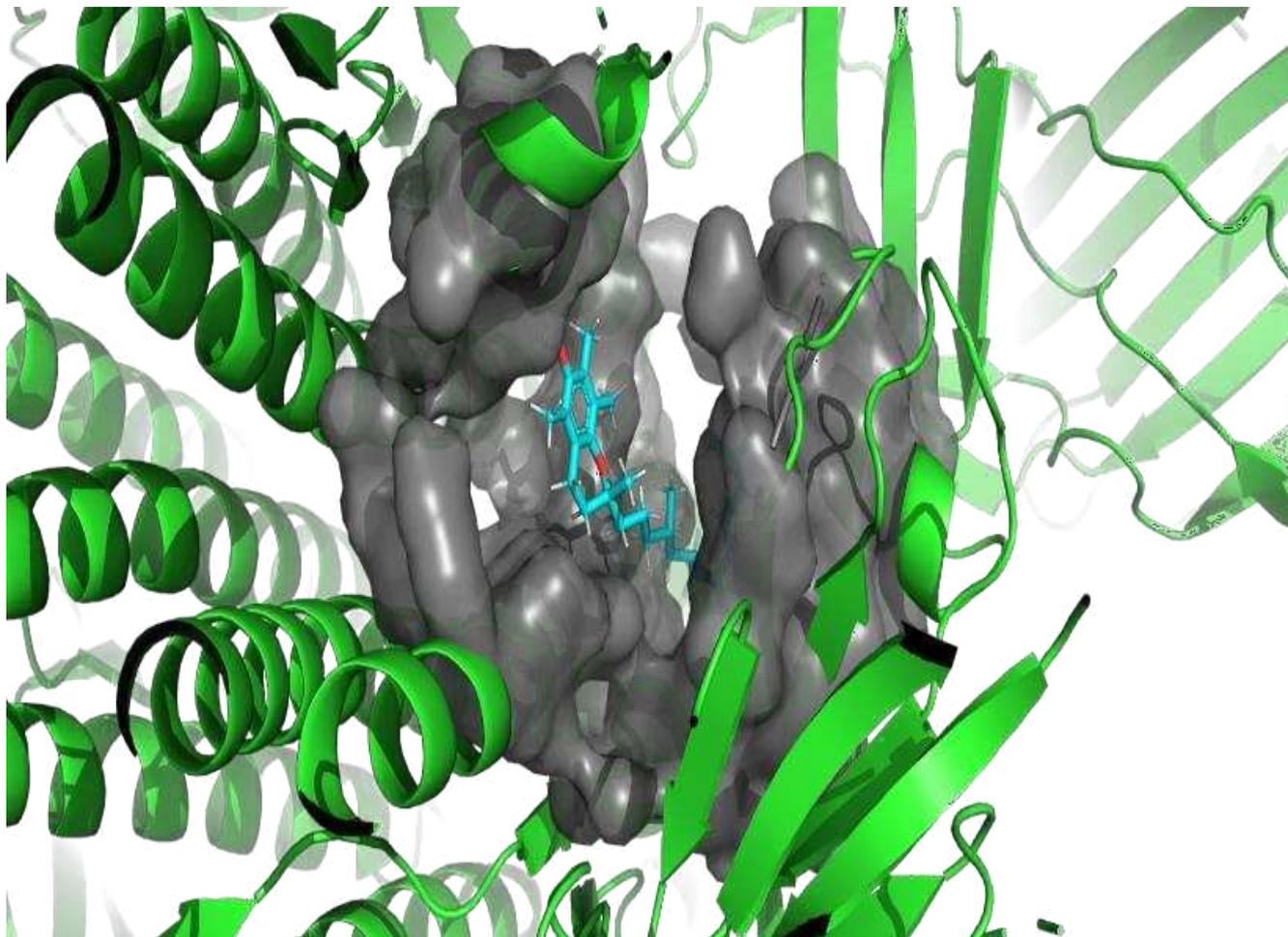
A) tridimensional da pose mais favorável para α tocoferol (em azul) interagindo com a estrutura RdRp. Representação da enzima (verde) e do ligante na cavidade (cinza escuro).

A) Mapas de interação 2D mostrando pose encaixada de menor energia de alfa-tocoferol em RdRp. Resíduos de aminoácidos em proximidade no mapa de interação com interações hidrofóbicas com cadeias laterais de aminoácidos em vermelho e ligações de hidrogênio em verde, distâncias em Angstroms.



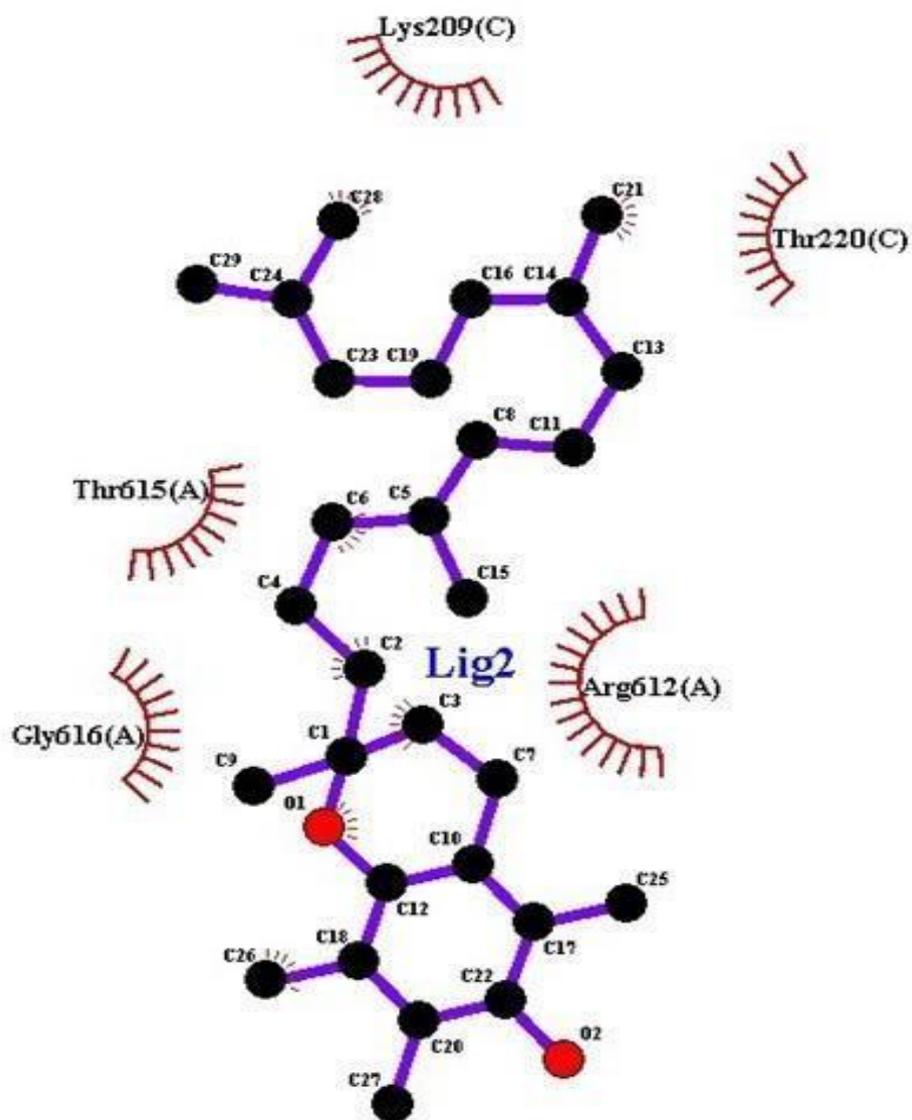
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 16 - Ancoragem molecular do alfa-tocoferol contra a Proteína Spike



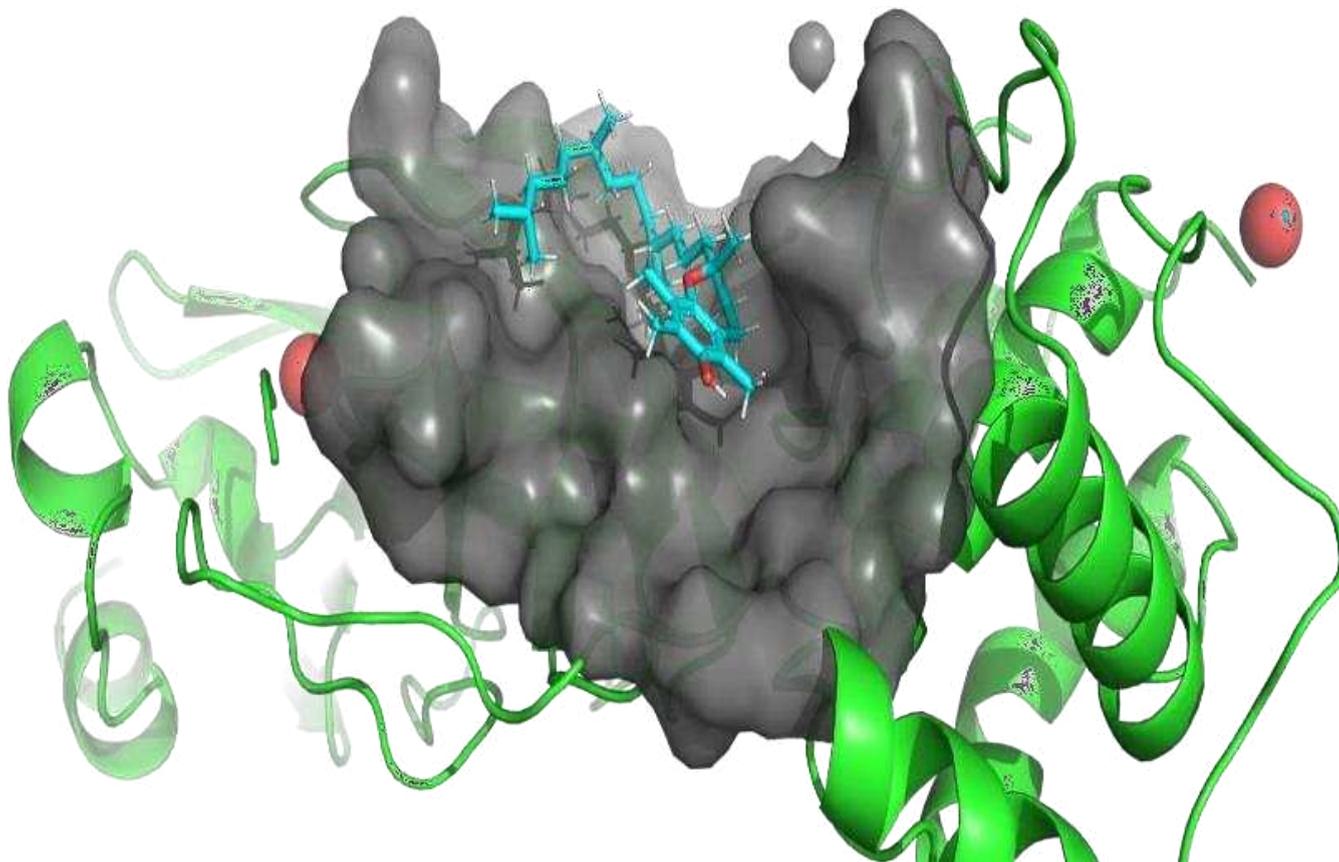
A) Modelo de encaixe 3D da pose mais favorável para alfa- tocoferol (em azul) interagindo com a estrutura Spike Ribbon da enzima (verde) e a ligação do ligante encaixada na cavidade (cinza escuro)

A) Mapas de interação 2D mostrando pose encaixada de menor energia de alfa-tocoferol em Spike. Resíduos de aminoácidos em proximidade no mapa de interação com interações hidrofóbicas com cadeias laterais de aminoácidos em vermelho e ligações de hidrogênio em verde, distâncias em Angstroms.



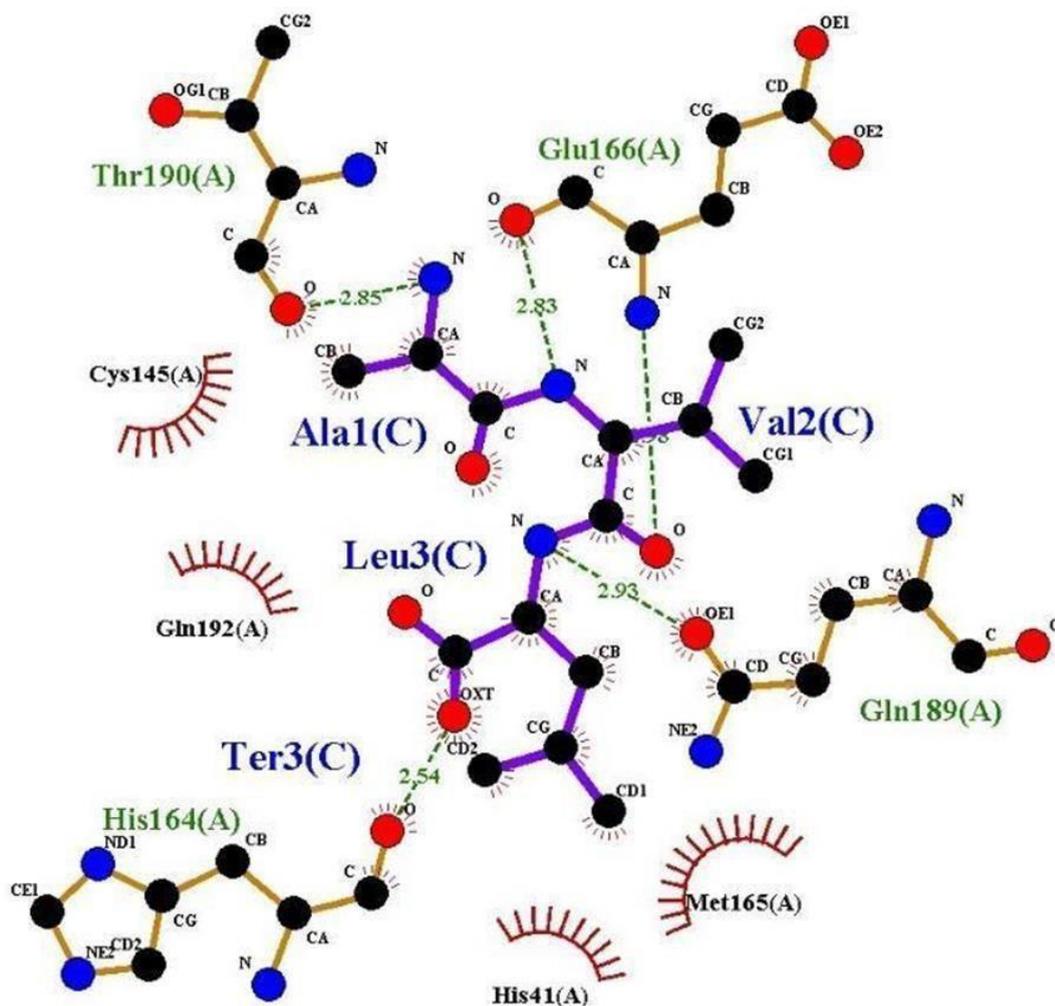
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 17 - Ancoragem molecular do alfa-tocoferol contra a proteína M^{PRO}.



A) Modelo de encaixe 3D da pose mais favorável para α -tocoferol (em azul) interagindo com a estrutura da fita M^{PRO} da enzima (verde) e a ligação do ligante encaixada na cavidade (cinza escuro).

A) Mapas de interação 2D mostrando pose encaixada de menor energia de α -tocoferol em M^{PRO}. Resíduos de aminoácidos próximos no mapa de interação. Interações hidrofóbicas com cadeias laterais de aminoácidos em vermelho, pontes salinas em azul e pontes de hidrogênio em verde, distâncias em Angstroms.



Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

SARS-CoV-2 continua circulando entre os indivíduos através do surgimento de novas variantes com habilidade de evasão no sistema imune, com facilidade de adaptação e transmissão mais eficiente. Vacinação regular de reforço da imunidade será necessária devido ao surgimento de novas variantes.

Embora estejam disponíveis para tratamento, a pesquisa de drogas antivirais continua a ser um desafio. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprovou quatro fármacos contra a Covid-19, listados logo abaixo:

Remdesivir teve aprovação concedida em 12/03/2021, antiviral produzido no formato de pó para diluição, produzido pelo laboratório Gilead. Este medicamento só pode ser administrado em paciente com idade igual ou maior que 12 anos, com peso corporal de no mínimo 40 Kg e estejam com pneumonia, necessitando do uso de oxigênio. Podendo ser usado somente dentro dos hospitais, não são vendidos em drogarias. **Sotrovimabe** com aprovação em 08/09/2021, é um anticorpo monoclonal que imita o sistema imunológico para combater o vírus. Indicado para uso em casos leves a moderados em pacientes com idade a partir de 12 anos, pesando no mínimo 40Kg, uso restrito somente em hospital em dose única de 500 mg via infusão intravenosa. **Baricitinibe** aprovado em 17/09/2021, inibidor seletivo e irreversível das enzimas janus kinases (JAKs), em especial JAK 1 e 2, responsáveis pela comunicação nas células hematopoéticas (são as células estaminais com potencial para dar origem a todos os tipos de células sanguíneas. Este tipo de células está presente na medula óssea, no sangue periférico e no sangue do cordão umbilical). Indicado apenas para uso em pacientes adultos hospitalizados que necessitem de oxigênio por máscara ou cateter nasal. **Paxlovid (nirmatrelvir + ritonavir)** aprovado em 30/03/2022, medicamento de uso oral, indicado apenas para adultos, podendo iniciar o tratamento após cinco dias de início dos sintomas. **Monupiravir** aprovado em 04/05/2022, medicamento de uso oral, indicado apenas para adultos, com restrição para grávidas, mulheres que estejam amamentando ou, que possam engravidar.

Neste contexto, observa-se que há muitas restrições nos medicamentos aprovados até a atualidade, e que a necessidade da busca por medicamentos que possam tratar e prevenir a infecção causada pelo vírus do SARS-CoV-2, principalmente, que estejam ao alcance da população continua. Por essas

razões, a identificação de novos candidatos a medicamentos promissores, especialmente de origem natural, é importante.

A busca por tratamentos eficazes contra o SARS-CoV-2, o vírus responsável pela pandemia de COVID-19, tem sido uma prioridade para a comunidade científica em todo o mundo. Dentre as abordagens exploradas, o uso de compostos naturais tem despertado grande interesse devido à sua ampla disponibilidade e potencial terapêutico. Neste trabalho, vamos discutir os resultados de uma análise *in silico* que avaliou a atividade antiviral de três compostos naturais: pertencendo a classe da vitamina E, o alfa-tocoferol e os flavonoides: caempferol e alfa-bisabolol.

Os flavonoides representam potenciais candidatos a interferir no ciclo de vida do coronavírus devido a capacidade de seus grupos funcionais de interagir com diferentes alvos celulares e interceptar múltiplas vias. Múltiplos flavonoides foram investigados contra o vírus da hepatite C (HCV) nas últimas décadas, devido ao seu papel crítico em uma ampla gama de doenças hepáticas. Apigenina, silibina, quercetina, ladaneína, sorbifol e pedalitina também são candidatos eficazes contra o mesmo vírus (BACHMETOV *et al.*, 2012) (FERENCI *et al.*, 2008) (SHIMIZU *et al.*, 2017). Efeitos inibitórios dependentes da concentração promissores semelhantes foram relatados para galato de epigalocatequina (EGCG) contra o vírus da hepatite B (HBV) e antígeno (HBeAg) (BACHMETOV *et al.*, 2012). Baicalina, genisteína e sulfato de rutina de sódio (SRS) têm propriedades inibitórias contra a entrada viral mediada pela fusão do envelope do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1).

Outro patógeno viral comum que causa doenças respiratórias é o rinovírus (RV). Usando metodologias baseadas em células BEAS-2B, a quercetina diminui os níveis de várias cepas. Além disso, ao pré-tratar as células com quercetina antes da infecção por RV, a endocitose viral parou significativamente, presumivelmente pela interação e inibição da enzima celular PI-3-quinase; o flavonol inibe de forma potente o estágio de replicação viral (GANESAN *et al.*, 2012). Além disso, Desideri *et al.* relataram que os novos derivados flavonóides 6-cloro-3-metoxi-flavona-4'-ácido carboxílico, 6-cloro-4'-oxazolinil e 6-cloro-3-metoxi-4'-oxazolinil flavona inibiram a atividade do rinovírus humano (HRV-1B) sem ter efeitos citotóxicos significativos nas células (DESIDERI *et al.*, 1995). Esses exemplos mostram as ações biológicas da aplicações de flavonoides como promissor contra o novo coronavírus, justificando assim, a escolha de trabalhar com essas moléculas nessa dissertação.

Estudos identificaram produtos naturais como inibidores virais. A atividade inibitória de trinta e um sesquiterpenos identificados a partir de óleos essenciais brasileiros (*Copaifera langsdorffii* Desf., *Croton cajucara* Benth. e *Siparuna guianensis* Aublet.) foi testada em estudos *in vivo* (COSTA *et al.*, 2022). Assim como os estudos recentes mostraram o potencial antiviral contra vários patógenos, *in silico* utilizando 171 componentes do óleo essencial onde, entre eles, o hidrocarboneto sesquiterpênico (E)- β -farneseno foi o melhor preditor de ancoragem contra M^{PRO}, sugerindo a atividade sinérgica onde os óleos essenciais que podem potencializar outros agentes antivirais (ESHARKAWY; 2022).

A análise *in silico* é uma ferramenta poderosa que permite a avaliação de moléculas em um ambiente virtual, simulando interações com alvos específicos. No caso do SARS-CoV-2, as proteínas Spike, M^{PRO} e RdRp são alvos importantes para o desenvolvimento de terapias antivirais (ABD EL HADI *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que o alfa-tocoferol apresentou ação contra as proteínas Spike, M^{PRO} e RdRp. Isso significa que esse composto natural pode ter potencial para inibir a entrada do vírus nas células, bem como a replicação viral. Vale ressaltar que o alfa-tocoferol é uma forma de vitamina E encontrada em diversos alimentos, como óleos vegetais, nozes e sementes (SZYMAŃSKA; NOWICKA; KRUK, 2017).

Outro composto natural avaliado, o caempferol, demonstrou atividade no alvo RdRp. Essa proteína é essencial para a replicação do vírus, sendo um alvo promissor para o desenvolvimento de terapias antivirais. O caempferol é encontrado em alimentos como cebola, brócolis e maçãs, o que torna sua utilização potencialmente viável (SINGLA *et al.*, 2021).

Por fim, o alfa-bisabolol também apresentou ação nas proteínas Spike e M^{PRO}. A proteína Spike é responsável pela ligação do vírus às células humanas, enquanto a M^{PRO} é uma enzima essencial para a replicação viral. O alfa-bisabolol é um composto encontrado em plantas como a camomila e o óleo de copaíba (DE *et al.*, 2017).

Como a estrutura cristalina do M^{PRO} foi investigada para co-cristalizar com pequenas moléculas, é bem conhecido como o local de interação entre a proteína e os candidatos a inibidor. O resultado da ancoragem reflete a energia de ligação dos compostos que foram corroborados por ensaios *in vitro*.

A análise *in vitro* desempenha um papel fundamental na pesquisa de novos tratamentos antivirais. Ela permite que os cientistas testem a eficácia dos compostos em um ambiente controlado, antes de prosseguir para estudos clínicos em humanos. Além disso, os ensaios de citotoxicidade são realizados para garantir que os compostos não sejam prejudiciais às células humanas.

Um dos compostos naturais estudados foi o alfa-tocoferol, uma forma de vitamina E, onde foi observado que o alfa-tocoferol foi seguro em uma concentração de 100 mg/mL, o caempferol e o alfa-bisabolol em concentrações de 6,25 mg/mL. Esses resultados sugerem que os compostos não causaram danos às células nas concentrações indicadas.

Nos ensaios de neutralização viral, conhecido como PRNT, foi utilizado para avaliar a eficácia de alguns compostos naturais contra o SARS-CoV-2. Entre os compostos testados, o alfa-tocoferol mostrou-se o mais promissor, seguidos do caempferol e alfa-bisabolol.

A mesma concentração de Dimetilsulfóxido (DMSO) utilizada para diluir a moléculas foi usada para controle (11,84 mg/mL), objetivando averiguar se não ocorreria interferência na ligação do vírus com célula, não tendo mostrado interferência.

A vitamina E é um antioxidante, estudos epidemiológicos demonstraram que a deficiência desse nutriente altera a resposta imune e a patogenicidade viral. Produtos naturais e/ou vitaminas e derivados, sintéticos ou semissintéticos representam 42% dos princípios ativos em uso na atualidade (NEWMAN; CRAGG, 2020).

O alfa-tocoferol, vitamina E, conhecido por suas atividades antioxidantes, demonstrou efeitos de resposta imune (JOVIC *et al.*, 2020). Aqui foi identificado o α -tocoferol como inibidor antiviral, com ação *in silico* contra SPIKE, o que significa que a proteína S do vírus é um fator chave envolvido, medeia o reconhecimento do receptor, ligação celular e fusão durante a infecção viral (HUANG *et al.*, 2020). O alfa-tocoferol pode estar inibindo o reconhecimento e o processo de fusão de membrana celular. Entretanto, faltam relatos na literatura que suportem essa hipótese, até o momento.

Outro alvo potencial é a polimerase dependente de RNA (RdRp). Ela é uma enzima essencial em vírus de RNA, que está envolvida na síntese de RNA *através da formação de ligações fosfodiéster* (MOUFFOUK *et al.*, 2021). Conforme demonstrado no estudo de (PACL *et al.*, 2021), os derivados solúveis em água do alfa-tocoferol D-alfa-tocoferol polietileno glicol succinato (TPGS) têm atividade potente, em sinergia com o remdesivir, como inibidor do SARS-CoV-2 RNA polimerase (RdRp), contra o Beta coronavírus. Nesse trabalho, os testes foram realizados usando a variante Delta.

O terceiro alvo proteico selecionado foi a M^{PRO} (principal protease) essencial para os processos de tradução e transcrição. Também não foram encontrados trabalhos envolvendo α -tocoferol e sua inibição para comparar esses resultados. De acordo com a simulação molecular e os resultados *in vitro*, o α -tocoferol mostrou uma atividade inibitória da COVID-19 de 98,2% indicando que o α -tocoferol poderá ser um possível inibidor do SARS-CoV-2 com triplo modo de ação, SPIKE, M^{PRO} e RdRp.

Segundo Uemura *et al.*, 2002, o α -tocopherol reduz a apoptose induzida pelo estresse oxidativo, além de demonstrar ação contra a peroxidação lipídica induzida por H₂O₂, aumentando os sistemas enzimáticos antioxidantes, como glutathione e catalase (UEMURA *et al.*, 2002), além de funcionar como um regulador de genes envolvidos no sistema imunológico, conforme evidenciado pelo aumento da resistência ao metabolismo lipídico e homeostase, aumento da inflamação (WALLERT *et al.*, 2014) e infecção pneumocócica (BOU GHANEM *et al.*, 2017). De fato, a migração transepitelial induzida por infecção de neutrófilos no pulmão é reduzida por alfa-tocopherol (BOU GHANEM *et al.*, 2015).

O composto Caempferol flavonol natural tem recebido ampla atenção por causa de seus efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos e antivirais, bem como no tratamento de diabetes e osteoporose, eficaz contra o vírus pseudorraiva (PRV) (LI *et al.*, 2021). Devido às suas atividades farmacológicas incluindo efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes. (AA *et al.*, 2020) exemplificou a ação desse flavonoide ao afirmar que, o alto nível de caempferol no intestino após a administração oral remodela a comunidade microbiana intestinal e modula o metabolismo mediado pela microbiota do triptofano, ácidos graxos e ácidos biliares secundários e produção de energia, o que pode contribuir para a eficácia do caempferol na artrite reumatoide. Em seus estudos (PAN *et al.*, 2018) demonstraram que o Caempferol aliviou os sintomas em modelos animais de artrite

após administração oral.

Em pesquisa *in silico* (JIANG *et al.*, 2022) explorou os alvos e os mecanismos moleculares do caempferol contra a co-ocorrência COVID-19 fibrose pulmonar (PF) usando a bioinformática e farmacologia de rede. Pessoas que sofreram da doença do coronavírus (COVID-19) são propensas a desenvolver fibrose pulmonar (PF), mas atualmente não há tratamento definitivo para a co-ocorrência COVID-19. Caempferol com efeitos antivirais e antifibróticos se mostrou como promissor e pode se tornar um tratamento potencial para COVID-19 e comorbidades para indivíduos com fibrose pulmonar.

O alho preto é rico em Caempferol, este é produzido pelo aquecimento do alho cru a altas temperatura. O extrato de alho preto inibiu 100% SARS-CoV-2 M^{PRO} a 0,5 mg/mL, com Cl₅₀ de 137 ± 10 µg/mL (NGUYEN *et al.*, 2021). O SARS- CoV-2 M^{PRO} é um dos alvos mais bem caracterizados para a descoberta de drogas antivirais. Ele desempenha um papel essencial na replicação do vírus, juntando-se as poliproteínas virais em mais de 11 locais na grande poliproteína 1ab. O acoplamento molecular do conjunto de compostos bioativos dos produtos das abelhas (mel e propólis) mostrou ação promissora nos sítios ativos, com ação do Caempferol nas enzimas M^{PRO} e RdRp (SHALDAM *et al.*, 2021).

Caempferol contra a proteína S, os dados mostraram que o composto interagiu com o domínio S2 da proteína S com alta afinidade de ligação (MOUFFOUK *et al.*, 2021). Nesse trabalho, os resultados mostram que o Caempferol tem melhor ação, na simulação de ancoragem de ligantes, no alvo RdRp, corroborando com o resultado encontrado por (SHALDAM *et al.*, 2021). Os resultados aqui apresentados, nos testes *in vitro*, mostram uma inibição de 21,80%.

Bisabolol é um sesquiterpeno que faz parte do óleo essencial de uma variedade de plantas, mas sua fonte comum é a camomila alemã, que possui um vasto componente bioativo, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos e antitumorais que foram atribuídas ao bisabolol. Foi investigada a atividade ansiolítica do bisabolol por meio da transmissão GABAérgica, tendo, os resultados evidenciados que o bisabolol pode mediar mecanismos ansiolíticos e sedativos envolvendo GABA A (TABARI; TEHRANI, 2017). *Waldheimia glabra* (Decne) é uma planta tradicionalmente chinesa, usada como incenso e medicamento antigripal pelos tibetanos, demonstrou ação contra o vírus da influenza H₃N₂ (DE *et al.*, 2017).

No estudo de (LUCAS-GÓMEZ *et al.*, 2020) alfa-Bisabolol, testado com RdRp, apenas 2 acabaram por ter uma interação próxima das posições ativas relatadas na literatura para SARS-CoV-2. Acontece que o alfa-Bisabolol é um exemplo de baixa afinidade de ligação com o SARS-CoV-2 e, portanto, sua capacidade de inibição pode ser baixa. Comparando com os resultados obtidos nesse trabalho, em simulações de ancoragem, ele teve ação inibitória relevante com a proteína spike e M^{PRO}, enquanto nas proteínas ligantes RdRp foi fraca. A atividade *in vitro* mostrou, na concentração testada, potencial inibitório de 8,8% contra a variante Delta do SARS-CoV-2.

Não foi encontrado na literatura muitos estudos sobre a ação antiviral do alfa-Bisabolol.

Analisando-se os resultados obtidos no presente estudo fica evidenciado o potencial dos compostos naturais como alternativas promissoras no combate ao SARS-CoV-2. A utilização de moléculas encontradas na natureza pode representar uma abordagem mais segura e acessível para o desenvolvimento de terapias antivirais.

7 CONCLUSÃO

As amostras avaliadas demonstraram, em diferentes níveis de atividade, potencial de neutralização do vírus SARS-CoV-2, variante Delta. Os testes com os flavonoides caempferol e alfa-bisabolol não apresentaram atividade antiviral significativa. Entretanto, o α -tocoferol apresentou atividade antiviral de 98,2%; tendo demonstrado, nos ensaios de ancoragem molecular, interação tripla com os alvos SPIKE, M^{PRO} e RdRp.

É importante ressaltar que esses resultados são preliminares e ainda precisam ser confirmados por mais estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, este estudo contribuiu para fornecer potenciais estratégias de desenvolvimento de alternativas para controle do SARS-CoV-2 tendo como base o uso de compostos naturais.

REFERÊNCIAS

AA, L. et al. Rebalancing of the gut flora and microbial metabolism is responsible for the anti-arthritis effect of kaempferol. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 1, p. 73–81, jan. 2020.

ABD EL HADI, S. R. et al. COVID-19: Vaccine Delivery System, Drug Repurposing and Application of Molecular Modeling Approach. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 15, p. 3313–3330, jul. 2021.

AGRAWAL, P. K.; AGRAWAL, C.; BLUNDEN, G. Quercetin: Antiviral Significance and Possible COVID-19 Integrative Considerations. **Natural Product Communications**, v. 15, n. 12, p. 1934578X2097629, dez. 2020.

ALZAABI, M. M. et al. Flavonoids are promising safe therapy against COVID-19. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, n. 1, p. 291–312, fev. 2022.

BACHMETOV, L. et al. Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity: Quercetin suppresses HCV through inhibition of NS3. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 19, n. 2, p. e81–e88, fev. 2012.

BOU GHANEM, E. N. et al. The Alpha-Tocopherol Form of Vitamin E Boosts Elastase Activity of Human PMNs and Their Ability to Kill *Streptococcus pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 161, 3 maio 2017.

BOU GHANEM, E. N. et al. The α -Tocopherol Form of Vitamin E Reverses Age-Associated Susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Modulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 3, p. 1090–1099, 1 fev. 2015.

CHAKRAVARTI, R. et al. A review on potential of natural products in the management of COVID-19. **RSC Advances**, v. 11, n. 27, p. 16711–16735, 2021.

CHEN, S. et al. Anti-glioblastoma Activity of Kaempferol via Programmed Cell Death Induction: Involvement of Autophagy and Pyroptosis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 614419, 10 dez. 2020.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, abr. 2020.

CHLAMYDAS, S.; PAPAVALASSILIOU, A. G.; PIPERI, C. Epigenetic mechanisms regulating COVID-19 infection. **Epigenetics**, v. 16, n. 3, p. 263–270, 4 mar. 2021.

COSTA, R. et al. Molecular Docking in silico Analysis of Brazilian Essential Oils Against Host Targets and SARS-CoV-2 Proteins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022.

DE, J. et al. Essential Oil Composition and Bioactivities of *Waldheimia glabra* (Asteraceae) from Qinghai-Tibet Plateau. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 460, 13 mar. 2017.

DE, J. et al. Essential Oil Composition and Bioactivities of *Waldheimia glabra* (Asteraceae) from Qinghai-Tibet Plateau. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 460, 13 mar. 2017.

DESIDERI, N. et al. *In vitro* Evaluation of the Anti-Picornavirus Activities of New Synthetic Flavonoids. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 6, n. 5, p. 298–306, out. 1995.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.

EDDIN, L. B. et al. Health Benefits, Pharmacological Effects, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Potential of α -Bisabolol. **Nutrients**, v. 14, n. 7, p. 1370, 25 mar. 2022.

ESHARKAWY, E. R.; ALMALKI, F.; HADDA, T. B. In vitro potential antiviral SARS-CoV-19- activity of natural product thymohydroquinone and dithymoquinone from *Nigella sativa*. **Bioorganic Chemistry**, v. 120, p. 105587, mar. 2022.

FERENCI, P. et al. Silibinin Is a Potent Antiviral Agent in Patients With Chronic Hepatitis C Not Responding to Pegylated Interferon/Ribavirin Therapy. **Gastroenterology**, v. 135, n. 5, p. 1561–1567, nov. 2008.

GANESAN, S. et al. Quercetin inhibits rhinovirus replication in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v. 94, n. 3, p. 258–271, jun. 2012.

GAO, Y. et al. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus. **Science**, v. 368, n. 6492, p. 779–782, 15 maio 2020.

GUEDES, I. A. et al. Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 5543, 10 mar. 2021.

HANNA, G. S. et al. Contemporary Approaches to the Discovery and Development of Broad-Spectrum Natural Product Prototypes for the Control of Coronaviruses. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 11, p. 3001–3007, 26 nov. 2021.

HARTENIAN, E. et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 37, p. 12910–12934, set. 2020.

HASSAN, S. A. et al. Coronavirus (COVID-19): A Review of Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. **Cureus**, 21 mar. 2020.

HOLSHUE, M. L. et al. First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 10, p. 929–936, 5 mar. 2020.

ISLAM, M. N. et al. Revisiting pharmacological potentials of *NIGELLA SATIVA* seed: A promising option for COVID -19 prevention and cure. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 3, p. 1329–1344, mar. 2021.

JIANG, Y. et al. Modeling Kaempferol as a Potential Pharmacological Agent for COVID-19/PF Co-Occurrence Based on Bioinformatics and System Pharmacological Tools. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 865097, 8 jun. 2022.

JIN, Y. et al. Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 372, 27 mar. 2020.

JOVIC, T. H. et al. Could Vitamins Help in the Fight Against COVID-19? **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2550, 23 ago. 2020.

LI, L. et al. The antiviral activity of kaempferol against pseudorabies virus in mice. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 247, 18 jul. 2021.

LIU, Y.; ROCKLÖV, J. The reproductive number of the Delta variant of SARS- CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 7, p. taab124, 11 out. 2021.

LUCAS-GÓMEZ, I. et al. Docking study for Protein Nsp-12 of SARS-CoV with Betalains and α -Bisabolol. 2020.

MARQUES, L. G. A. et al. O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**, v. 16, n. Supl. 2, p. 293–314, 4 mar. 2022.

MASTERS, P. S. The Molecular Biology of Coronaviruses. In: MASTERS, P. S. **Advances in Virus Research**. [s.l.] Elsevier, 2006. v. 66. p. 193–292.

MENDOZA, M. et al. Pre-eclampsia-like syndrome induced by severe COVID- 19: a prospective observational study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 127, n. 11, p. 1374–1380, out. 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MOUFFOUK, C. et al. Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS- CoV-2 proteases (3CLpro and PLpro), spike protein, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2). **European Journal of Pharmacology**, v. 891, p. 173759, jan. 2021.

MWENDA, M. et al. Detection of B.1.351 SARS-CoV-2 Variant Strain — Zambia, December 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 70, n. 8, p. 280–282, 26 fev. 2021.

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**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NGUYEN, T. T. H. et al. The Inhibitory Effects of Plant Derivate Polyphenols on the Main Protease of SARS Coronavirus 2 and Their Structure–Activity Relationship. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1924, mar. 2021.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, dez. 2011.

PACL, H. T. et al. **Water-soluble tocopherol derivatives inhibit SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase**. [s.l.] Microbiology, 14 jul. 2021. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.07.13.449251>. Acesso em: 13 jun. 2023.

PAN, D. et al. Kaempferol inhibits the migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by blocking activation of the MAPK pathway. **International Immunopharmacology**, v. 55, p. 174–182, fev. 2018.

SHALDAM, M. A. et al. In silico screening of potent bioactive compounds from honeybee products against COVID-19 target enzymes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 30, p. 40507–40514, ago. 2021.

SHIMIZU, J. F. et al. Flavonoids from *Pterogyne nitens* Inhibit Hepatitis C Virus Entry. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16127, nov. 2017.

SINGLA, R. K. et al. Natural Products for the Prevention and Control of the COVID-19 Pandemic: Sustainable Bioresources. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 758159, dez. 2021.

SUN, L. et al. Coronavirus Papain-like Proteases Negatively Regulate Antiviral Innate Immune Response through Disruption of STING-Mediated Signaling. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30802, fev. 2012.

SZYMAŃSKA, R.; NOWICKA, B.; KRUK, J. Vitamin E - Occurrence, Biosynthesis by Plants and Functions in Human Nutrition. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, jul. 2017.

SZYMAŃSKA, R.; NOWICKA, B.; KRUK, J. Vitamin E - Occurrence, Biosynthesis by Plants and Functions in Human Nutrition. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, jul. 2017.

TABARI, M. A.; TEHRANI, M. A. B. Evidence for the involvement of the GABAergic, but not serotonergic transmission in the anxiolytic-like effect of bisabolol in the mouse elevated plus maze. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 10, p. 1041–1046, out. 2017.

UEMURA, M. et al. α -Tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. **European Journal of Pharmacology**, v. 456, n. 1–3, p. 29–37, dez. 2002.

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**, v. 91, n. suppl 3, p. e20190208, 2019.

WALLERT, M. et al. Regulatory metabolites of vitamin E and their putative relevance for atherogenesis. **Redox Biology**, v. 2, p. 495–503, 2014.

WANG, P. et al. **Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization**. [s.l.] Microbiology, 2 mar. 2021. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.01.433466>. Acesso em: 13 jul. 2023.

WIBMER, C. K. et al. SARS-CoV-2 501Y.V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma. **Nature Medicine**, v. 27, n. 4, p. 622–625, abr. 2021.

WILLETT, B. J. et al. **The hyper-transmissible SARS-CoV-2 Omicron variant exhibits significant antigenic change, vaccine escape and a switch in cell entry mechanism**. [s.l.] Infectious Diseases (except HIV/AIDS), 3 jan. 2022. Disponível em: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.01.03.21268111>. Acesso em: 13 jul. 2023.

WU, K. et al. **mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants**. [s.l.] Immunology, 25 jan. 2021. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.01.25.427948>. Acesso em: 13 jul. 2023.

YAN, B. et al. Effects and safety of herbal medicines among community- dwelling residents during COVID-19 pandemic: A large prospective, randomized controlled trial (RCT). **Phytomedicine**, v. 85, p. 153403, maio 2021.

ZANNELLA, C. et al. Antiviral Activity of Vitis vinifera Leaf Extract against SARS-CoV-2 and HSV-1. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1263, 29 jun. 2021.

ZENG, N.; CHEN, X.; LIU, Z. Natural Products and Nanotechnology Against Coronavirus Disease 2019. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 819969, 10 fev. 2022.

ZHOU, Z.; ZHU, Y.; CHU, M. Role of COVID-19 Vaccines in SARS-CoV-2 Variants. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 898192, 20 maio 2022.