

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INGRID GARCIA DE ARAUJO

Atividade do extrato de *Cytinus hypocistis* contra infecções por SARS-CoV-2

Maringá

2022

INGRID GARCIA DE ARAUJO

Atividade do extrato de *Cytinus hypocistis* contra infecções por SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

A663a

Araujo, Ingrid Garcia de

Atividade do extrato de *Cytinus hypocistis* contra infecções por SARS-CoV-2 / Ingrid Garcia de Araujo. -- Maringá, PR, 2022.  
34 f.: il. color., figs.

Orientador: Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. SARS-CoV-2. 2. Covid-19. 3. Taninos. 4. *Cytinus hypocistis*. 5. Extratos vegetais - Atividades antivirais. I. Seixas , Flavio Augusto Vicente, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 571.2

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366

# FOLHA DE APROVAÇÃO

INGRID GARCIA DE ARAUJO

Atividade do extrato de *Cytinus hypocistis* contra infecções por SARS-CoV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovada em 27 de maio de 2022.

## COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas – orientador  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Otávio Akira Sakai  
IFPR Umuarama (membro)

Prof. Dr. Quirino Alves de Lima Neto  
Universidade Estadual de Maringá (membro)

## **Biografia**

Ingrid Garcia de Araujo nasceu no dia 10 de setembro de 1997 na cidade de Maringá, Paraná. Graduada em Biomedicina (Bacharelado) em 2018 pela Universidade Estadual de Maringá. Em 2020 iniciou o Curso de Mestrado em Biologia Celular e Molecular na Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, PR.

Dedico este trabalho aos meus pais, meus  
maiores exemplos de vida.

## **Agradecimentos**

À Deus toda honra e gratidão, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, por todo amor incentivo e investimento durante toda minha jornada acadêmica.

Ao meu noivo, por toda compreensão e apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas por sua dedicação e profissionalismo durante todo processo permitindo a realização e conclusão deste trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF-UEM), em especial a Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Fernandez e José Renato Pattaro Júnior que esteve presente em todas as etapas deste projeto.

Por fim, à CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro, e ao COMCAP/UEM pelo uso da infraestrutura de pesquisa.

## Apresentação

Esta dissertação de mestrado é composta por um trabalho redigido na forma de artigo científico a ser submetido na revista *Clinical Biochemistry*, fator de impacto 3.281.

### **Atividade do extrato de *Cytinus hypocistis* contra infecções por SARS-CoV-2.**

Ingrid Garcia de Araujo<sup>1</sup>, José Renato Pattaro Jr<sup>1</sup>, Gisele Strieder Philippsen<sup>2</sup>, Ana Rita Silva<sup>3</sup>, Carolina Borsoi Moraes<sup>4</sup>; Cecilia Gomes Barbosa<sup>4</sup>; Lúcio Holanda Freitas-Junior<sup>4</sup>; Lillian Barros<sup>3</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>5</sup>, Maria Aparecida Fernandez<sup>6</sup>, Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Depto. de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Jandaia do Sul, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Bragança, Portugal

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>5</sup> Depto. de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>6</sup> Depto. de Biotecnologia Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

#### **\* Autor de correspondência**

favseixas@uem.br

Universidade Estadual de Maringá - UEM

Av Ângelo Moreira da Fonseca, 1800, Pq Daniele

87506-370, Umuarama, PR, Brasil

## Resumo

Em novembro de 2019, foram relatados casos de pneumonia não identificada em indivíduos que tiveram contato com o mercado de frutos do mar em Wuhan na China continental. O agente causador desta pneumonia foi isolado e designado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus como Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavírus (SARS-CoV-2) e a doença causada pelo mesmo como Covid-19. Em virtude de seu crescimento exponencial, essa doença logo se tornou pandemia e, com isso, a busca por medicamentos antivirais para o tratamento se tornou uma necessidade urgente. Neste contexto, os produtos naturais são uma alternativa interessante frente aos medicamentos sintéticos, pois são consumidos há muito tempo por meio da medicina tradicional. Muitos componentes taninos encontrados em extratos naturais já se mostraram efetivos no tratamento de doenças virais e bacterianas, podendo ser explorados contra a Covid-19. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral de extratos vegetais disponíveis na biblioteca de produtos naturais da UEM, por meio da inibição da protease principal do SARS-CoV-2 (M<sup>pro</sup>), e por meio da inibição da infecção viral em modelo celular. Como resultado, o extrato vegetal que apresentou maior atividade inibitória da M<sup>pro</sup> foi o de *Cytinus hypocistis*, extraído por ultrassom (CUAE), com inibição superior a 90%. Por ter apresentado os melhores resultados na inibição de alvo específico, esse extrato foi selecionado para os ensaios em células Vero infectadas com SARS-CoV-2. Neste ensaio, foi observada inibição de 99,6% da infecção em uma única linhagem celular testada, com índice de seletividade de 42,7. Embora o extrato tenha demonstrado atuar em um alvo viral específico, o modelo de infecção celular testado não permite excluir a possibilidade de que um dos componentes do extrato possa ter bloqueado a infecção por um mecanismo diferente, como impedir a ligação da proteína *spike* ao receptor ACE2. Diante destes resultados promissores, evidencia-se a necessidade de isolar subfrações do extrato de *C. hypocistis* de modo a identificar o(s) componente(s) responsável(is) pela inibição da infecção viral e, com isso, elucidar o mecanismo de proteção observado. Nossos resultados também demonstram o potencial de uso de produtos naturais de origem vegetal no tratamento da Covid-19.

**Palavras-chave:** SARS-CoV-2; M<sup>pro</sup>; Covid-19; *Cytinus hypocistis*; taninos.

## Abstract

In November 2019, cases of unidentified pneumonia were reported in individuals who had contact with the seafood market in Wuhan at mainland China. The causing agent of this pneumonia was isolated and designated by the International Committee on Taxonomy of Viruses as Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-2) and the disease caused by it as Covid-19. Due to the exponential growth of this disease, soon it turns to pandemic, making the search for antiviral drugs for its treatment an urgent need. In this context, natural products are an interesting alternative to synthetic drugs, since they have been consumed for a long time via traditional medicine. Many tannin components found in natural extracts have already been shown to be effective in the treatment of viral and bacterial diseases, and may be exploited against covid-19. Therefore, the objective of this work was to evaluate the antiviral activity of plant extracts available in the UEM natural products library, through inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 ( $M^{pro}$ ), and through inhibition of viral infection in cell model. As a result, the plant extract that showed the highest  $M^{pro}$  inhibitory activity was that of *Cytinus hypocistis*, extracted by ultrasound (CUAE), presenting inhibition greater than 90%. Because it showed the best results in specific target inhibition, this extract was selected for assays in Vero cells infected with SARS-CoV-2. In this test, was observed 99.6% inhibition of the infection in a single cell line, with a selectivity index of 42.7. Although the extract has been shown to act on a specific viral target, the cellular infection model assayed does not allow to exclude the possibility that one of the components of the extract may have blocked the infection by a different mechanism, such as preventing the binding of the spike protein to the ACE2 receptor. In view of these promising results, it is evident the need to isolate subfractions of the *C. hypocistis* extract in order to identify the component(s) responsible for the inhibition of viral infection and, with this, to elucidate the protection mechanism observed. Our results also demonstrate the potential for using natural products in the treatment of Covid-19.

**Key-words:** SARS-CoV-2;  $M^{pro}$ ; Covid-19; *Cytinus hypocistis*; taninos.

## **Atividade do extrato de *Cytinus hypocistis* contra infecções por SARS-CoV--2.**

Ingrid Garcia de Araujo<sup>1</sup>, José Renato Pattaro Jr<sup>1</sup>, Gisele Strieder Philippsen<sup>2</sup>, Ana Rita Silva<sup>3</sup>, Carolina Borsoi Moraes<sup>4</sup>; Cecilia Gomes Barbosa<sup>4</sup>; Lúcio Holanda Freitas-Junior<sup>4</sup>; Lillian Barros<sup>3</sup>, Rosane Marina Peralta<sup>5</sup>, Maria Aparecida Fernandez<sup>6</sup>, Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Depto. de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal do Paraná, Jandaia do Sul, PR, Brasil.

<sup>3</sup> Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Bragança, Portugal

<sup>4</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>5</sup> Depto. de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

<sup>6</sup> Depto. de Biotecnologia Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

## **Sumário**

<b>Introdução</b>	<b>13</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>16</b>
Material biológico	16
Transformação bacteriana	16
Expressão e purificação da proteína	16
Ensaio de atividade da protease inespecífica utilizando substrato caseína	17
Ensaio de atividade proteolítica específica utilizando substrato fluorogênico	18
Ensaio de inibição da M <sup>pro</sup> de SARS-CoV-2.	18
Ensaio em células Vero em cultura	19
<b>Resultados</b>	<b>21</b>
Expressão e purificação de M <sup>pro</sup>	21
Especificidade de M <sup>pro</sup>	21
Prospecção de inibidores de protease de SARS-CoV-2	22
Ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral em células Vero E6	24
<b>Discussão</b>	<b>26</b>
<b>Conclusão</b>	<b>28</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>30</b>
<b>Apêndice 1</b>	<b>35</b>

## Introdução

A doença infecciosa Covid-19, causada pelo novo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) teve seu início na China, na cidade de Wuhan, província de Hubei, e rapidamente se espalhou para todo o mundo, tornando-se uma pandemia, atingindo mais de 300 milhões de pessoas, e levando a morte de mais de 5 milhões indivíduos até o momento.<sup>1,2</sup>

Os coronavírus (CoVs) fazem parte da família *Coronaviridae* da ordem Nidovirales e compõem um grupo de diversos vírus envelopados com genoma de RNA de fita simples e de sentido positivo. Os vírus pertencentes a esse grupo atuam como agentes etiológicos de diversas patologias respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas, tendo poder infectante em diversas espécies animais, com diversos graus de gravidade, sendo atualmente o SARS-CoV-2 a forma mais patogênica em comparação ao SARS-CoV identificado em 2002, e ao coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) registrado em 2013.<sup>3,4</sup>

O genoma de SARS-CoV-2 é constituído por 13 a 15 fases de leitura abertas (ORFs) contendo ~30.000 nucleotídeos. As ORFs são organizadas como replicase e protease (1a-1b), e as principais proteínas estruturais: proteínas *spike* (**S**), envelope (**E**), membrana (**M**) e nucleocapsídeo (**N**) são consideradas principais alvos no desenvolvimento de drogas e vacinas por desempenharem importantes funções na entrada, fusão e sobrevivência viral nas células hospedeiras. O genoma de SARS-CoV-2 mostra uma alta semelhança com o genoma de outros coronavírus identificados anteriormente, compartilhando mais de 80% de identidade de sequência com SARS-CoV e MERS-CoV e mais de 90% de identidade de sequência em relação às enzimas essenciais e proteínas estruturais.<sup>5,6,7</sup>

Em termos estruturais, os CoVs são dependentes das proteínas *spike* (**S**) para realizarem sua ligação ao receptor de superfície na célula hospedeira após entrada no organismo, que pode acontecer pela via direta através de tosse, espirro e perdigotos, além de transmissão por contato com mucosa oral, nasal e dos olhos, bem como o contato de pessoa para pessoa através de contato direto ou indireto, de fluidos e saliva.<sup>8,9</sup> A proteína **S** é fundamental para o processo de transmissão viral, pois medeia a ligação da proteína *spike*, da membrana viral, com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) expressa na superfície de diversas células do corpo, como o epitélio do sistema respiratório.<sup>10</sup> O domínio S1 da proteína *spike* reconhece e se liga ao receptor do hospedeiro através do domínio de ligação ao receptor (RBD), seguido por uma transição conformacional do domínio S2 para facilitar a fusão da membrana celular.<sup>11,12,13</sup> A protease transmembranar serina 2 (TMPRSS2) desempenha um papel fundamental na fusão da

membrana viral com a membrana da célula hospedeira, ativando a proteína S. O RBD se liga aos receptores ACE2 do hospedeiro, permitindo que o SARS-CoV-2 entre na célula epitelial que compõe a mucosa do trato respiratório<sup>13</sup>. A afinidade com a qual a proteína S do SARS-CoV-2 se liga ao ACE2 é mais de dez vezes maior que a do SARS-CoV, característica esta que facilita o contágio entre a população humana.<sup>14</sup>

O sequenciamento do genoma do SARS-CoV-2 impulsionou a corrida para determinar um alvo-chave para o tratamento<sup>15</sup>. As enzimas mais promissoras para o tratamento são a glicoproteína *Spike* a qual é utilizada em pesquisas para terapêutica e diagnóstico, a NSP12, também conhecida como *RNA-directed RNA polymerase* (EC:2.7.7.48) e a protease principal NSP5 (M<sup>pro</sup>), também conhecida como 3 cystein-like proteinase, 3CL<sup>pro</sup> ou simplesmente 3CL (EC:3.4.22.69). A M<sup>pro</sup> atua no processamento proteolítico das poliproteínas replicase (pp1a e pp1ab). Após o processamento proteolítico, os produtos de tradução de pp1a modulam os fatores da célula hospedeira, preparando a célula para a síntese de RNA viral por meio da formação de complexos de replicação, enquanto os produtos de tradução C-terminal de pp1ab são responsáveis pela regulação dos processos de replicação de RNA e transcrição impulsionados pelo RdRp viral (nsp12).<sup>16</sup> A escolha destas enzimas como alvo de fármacos é devido à ausência de proteínas homólogas com humanos.<sup>14,17</sup>

Dentre os alvos farmacológicos bem caracterizados dos coronavírus, a protease principal M<sup>pro</sup>, de massa molecular de 33,8 kDa, é considerada a mais promissora por seu papel fundamental descrito no processamento das poliproteínas que são traduzidas do RNA viral para produzir proteínas virais funcionais. Essa enzima está envolvida principalmente na regulação da replicação e transcrição de vírions, sendo assim direcionada para a pesquisa que visa projetar e desenvolver moléculas terapêuticas eficazes contra a Covid-19.<sup>18</sup>

Devido a urgência no desenvolvimento de medicamentos eficazes contra a Covid-19, diferentes estratégias foram adotadas para acelerar o processo, como o reposicionamento de fármacos, que visa avaliar a efetividade de medicamentos já disponíveis no mercado, que já passaram por testes clínicos e possuem dosagens e efeitos adversos conhecidos.<sup>19</sup> Neste contexto, os produtos naturais de origem vegetal são uma alternativa interessante comparados aos medicamentos sintéticos, pois são consumidos há séculos por meio da medicina tradicional e muitos também já passaram por testes que avaliavam suas toxicidades.<sup>20,21</sup>

Vários grupos de pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (UEM), se dedicam a extrair, caracterizar quimicamente e testar as propriedades funcionais e antimicrobianas de

extratos vegetais. A junção destas informações possibilitou a formação da biblioteca de produtos naturais da UEM, a qual é formada por amostras de extratos liofilizados e caracterizados das plantas: Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*),<sup>22</sup> Sibipiruna (*Poincianella pluviosa*),<sup>23</sup> a qual apresenta suas frações aquosas (FAQ), acetato de etila (EtAC) e subfrações (F1 a F13) já caracterizadas, Chá-verde (*Camellia sinensis*),<sup>24</sup> Pútegas (*Cytinus hypocistis*),<sup>25</sup> Açoita cavalo (*Luehea divaricata*),<sup>26</sup> Erva-mate (*Ilex paraguariensis*),<sup>27</sup> Catuaba (*Trichilia catigua*),<sup>28</sup> e extrato de Casca de uva Merlot (*Vitis vinífera*).<sup>29</sup>

Dentre os extratos citados, o composto vegetal proveniente de Pútegas (*Cytinus hypocistis*), oriunda do território português, particularmente dos Açores, são plantas sem raízes, sem caule e sem folhas, sendo as flores a única parte visível, e só emergem no período reprodutivo nos tecidos do hospedeiro que são plantas silvestres pertencente aos membros da família *Cistus*. Os extratos dessa planta têm ganhado destaque quanto as suas propriedades antimicrobianas, sendo explorada no tratamento da disenteria e por suas qualidades adstringentes<sup>30</sup>. Outros usos relatados incluem o tratamento de tumores da garganta e de inflamações oculares e como emenagogo.<sup>31</sup> Essas atividades biológicas de *C. hypocistis* (antioxidante, antitirosinase, anti-inflamatória e antibacteriana) estão associadas a altos níveis de taninos hidrolisáveis. Os taninos são uma classe de compostos fenólicos comumente encontrados em plantas e estudados por sua atividade biológica e propriedades inibitórias enzimáticas.<sup>25</sup>

As propriedades antimicrobianas dos taninos são bem conhecidas e documentadas, incluindo o seu papel como possível antiviral em estudos com o vírus do HIV,<sup>32</sup> HSV<sup>33</sup> e hepatite<sup>34</sup>; doenças bacterianas causadas por cepas de *Staphylococcus*<sup>35</sup>; e doenças parasitárias,<sup>36</sup> o que levanta a hipótese de serem explorados contra a Covid-19.

Levando em consideração o potencial antimicrobiano dos taninos e a disponibilidade de uma biblioteca de compostos vegetais caracterizados por diversos grupos de pesquisa da UEM, o objetivo do trabalho foi testar a atividade antiviral de extratos extraídos de *Cytinus hypocistis*, Chá Roxo (*Camellia sinensis*), Açoita cavalo (*Luehea divaricata*) e o composto sintetizado PGG (*pentagalloyl glucose*), como inibidores da protease principal (M<sup>pro</sup>) de SARS-CoV-2.

## **Materiais e Métodos**

### **Material Biológico**

O vetor de expressão pET22b (+) contendo o gene de M<sup>pro</sup> [Pet22b (+)M<sup>pro</sup> (His)6x] foi obtido da empresa FastBio. Este vetor, controlado pelo promotor T7, contém resistência ao antibiótico ampicilina. Além de codificar uma cauda de 6 resíduos de histidina (His-tag) na extremidade C-terminal de M<sup>pro</sup>, gerando a proteína M<sup>pro</sup>(His)6.

A bactéria *Escherichia coli*, cepa BL21(DE3), que possui o gene T7 RNA Polimerase sob o controle do promotor lacUV5 induzível por IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) foi utilizada para a superexpressão da proteína de interesse.

### **Transformação Bacteriana**

As bactérias competentes de *Escherichia coli* BL21(DE3) foram transformadas com o vetor [Pet22b(+)-M<sup>pro</sup>(His)6x] por choque térmico. Esse tipo de transformação bacteriana consiste no aumento repentino de temperatura, gerando uma diferença de pressão entre o exterior e o interior celular ocasionando a formação de poros na membrana plasmática bacteriana, permitindo assim a entrada do plasmídeo na célula.<sup>37</sup>

A seleção das bactérias transformadas foi realizada pelo uso de antibiótico ampicilina, assim, somente cresceram no meio de cultura contendo ampicilina as bactérias que, de fato, receberam o plasmídeo que possui o gene de resistência ao antibiótico.

### **Expressão e purificação da proteína**

Culturas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com pET22b (+) foram crescidas aerobicamente em frasco Erlenmeyer contendo 200 mL de meio Luria Bertani (LB) com 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de ampicilina. A quantidade de meio utilizada não ultrapassou 20% do volume total do frasco para uma melhor oxigenação da cultura. Esse meio foi incubado a 37 °C em agitador orbital a 75 rpm até atingir 0,6 de DO<sub>600</sub>. Após, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,5 mM, assim ocorreu a indução a 20 °C por 14h a 175 rpm. Após a indução, a cultura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min a 4 °C, e o pellet lavado com Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, e armazenado a -20 °C.

No processo de purificação, o pellet da cultura foi ressuscitado em tampão de *binding* (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol, pH 8,0) com 10% glicerol, 0,2% de Triton X-100, e inibidor de protease 1×, e sonificado em banho de gelo por 4 minutos com pulsos de 20 seg *On* e 20 seg *Off* com amplitude de 60%, para o rompimento das células em sonicador Fisher Scientific. As células rompidas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C e tiveram o sobrenadante filtrado em filtro de seringa Millex® de 0,22 µm (MerckMillipore), para a separação da fração de proteínas solúveis. A purificação da M<sup>pro</sup> ocorreu a partir da fração solúvel por meio de cromatografia de afinidade em FPLC, Fast Protein Liquid Chromatography (ÄKTA Purifier, GE), em coluna HisTrap. A amostra foi injetada no equipamento utilizando um Superloop de 10 mL. A eluição da proteína M<sup>pro</sup> ocorreu com tampão de eluição (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl e 300 mM Imidazol, pH 8.0). A análise da purificação foi realizada por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Gel de empilhamento 5% e gel de resolução 12%).<sup>38</sup>

### **Ensaio de atividade da protease inespecífica utilizando substrato caseína**

Inicialmente, foi realizada uma diluição 1:1 da enzima M<sup>pro</sup> com concentração de 0.735 mg.mL<sup>-1</sup>. Dessa diluição foram adicionados 2.4 mL a um tubo de ensaio contendo 21.6 mL de solução de caseína 1% preparada em tampão NaOH 0,01M e Fosfato de Sódio 0,25M, totalizando 24 mL de solução. Essa solução foi levada a uma temperatura de 30 °C no banho-maria e incubada nos tempos: 0, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h e 24h. Para o controle da reação foi adicionado, primeiramente, somente a M<sup>pro</sup>.

Foram retiradas alíquotas do tubo de ensaio nos tempos citados, e separados em microtubos. Logo em seguida, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) a 10% para término da reação. Nos tubos controle, imediatamente após a adição de TCA na enzima, foi adicionado solução do substrato caseína. A atividade da protease é interrompida nos tubos brancos por meio da inativação da enzima pelo TCA antes da adição substrato caseína.

Os tubos foram centrifugados em centrífuga Eppendorf® por 5 min a 8000 g, temperatura ambiente, e o sobrenadante armazenado e utilizado para mensuração em espectrofotômetro UV-Vis, modelo NanoDrop® 2000.

### **Ensaio de atividade proteolítica específica utilizando substrato fluorogênico**

O substrato fluorogênico LGS AVLQ-Rh110-dP (Boston Biochem, USA) foi utilizado para o ensaio proteolítico da M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2. Este substrato contém a sequência de clivagem NSP4/NSP5, GVLQ↓SG19, e atua como um substrato peptídico específico para esta protease. A fluorescência foi mensurada continuamente em um leitor de placas FlexStation 3 (Molecular Devices, USA) ao longo de 5 min. A atividade catalítica (taxa de reação) em cada condição foi determinada por meio de regressão linear nos primeiros 30 segundos de reação. As análises foram realizadas usando o programa MicroCal Origin 6.0.

### **Ensaio de inibição da M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2.**

Os compostos candidatos a inibidores oriundos dos extratos das plantas *Cytinus hypocistis* denominados CHAE (extração por calor) e CUAE (extração por ultrassom), foram gentilmente cedidos pela profa. Lillian Barros (ICB Bragança, Portugal), enquanto que os extratos de Açoita cavalo e Chá roxo, além do composto PGG, foram gentilmente cedidos pela profa. Dra. Rosane Maria Peralta do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os ensaios na presença dos potenciais inibidores foram de ponto único, em que foi utilizado 10 µM de substrato fluorogênico, 1 µM de M<sup>pro</sup> em tampão de ensaio com 5 µL de inibidor a 2.63 mg.mL<sup>-1</sup> (concentração final de 43.8 µg.mL<sup>-1</sup>), com volume final de 300 µL.

Os compostos testados foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), este também foi testado para verificar se poderia influenciar a velocidade da reação enzimática. Foram feitas duas soluções controle, o controle 1 (Ctrl 1) com solução tampão no lugar do inibidor e o controle 2 (Ctrl 2) com 5 µL de DMSO puro no lugar do inibidor. A taxa de inibição foi calculada em comparação com o poço controle 2, uma vez que o DMSO apresentou atividade inibitória da enzima.

Os reagentes foram misturados e pré-incubados por 10 min, para que ocorresse o equilíbrio térmico com a temperatura do ensaio à 37 °C. A reação teve início com a adição da enzima M<sup>pro</sup>. Todas as corridas foram subtraídas de suas respectivas linhas de base obtidas com todos os componentes de cada teste, exceto a M<sup>pro</sup>. O tempo de reação do ensaio foi de 5 min, realizado a leitura de fluorescência a cada 10 segundos. A atividade catalítica (taxa de reação)

na presença dos inibidores foi calculada como descrito anteriormente e os ensaios foram realizados em duplicata.

### **Ensaio em células Vero em cultura**

Os extratos que apresentaram atividade inibitória da M<sup>pro</sup> foram encaminhados para realização de ensaios de atividade antiviral em células Vero no laboratório NB3 do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB, da Universidade de São Paulo (USP) em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Lúcio de Freitas Jr. Os compostos foram diluídos em DMSO para concentração de 20 mg·mL<sup>-1</sup> e foram testados em dose resposta. Antes de realizar o tratamento das células, os compostos foram diluídos 33,33 × em tampão fosfato salino (PBS), e 10 µL dessas soluções foram transferidos para placas de ensaio, tendo, portanto, um fator de diluição de 200x. Como controle, foi utilizada a cloroquina. Foram utilizadas placas de 384 poços em DMEM High para semear as células Vero, as quais foram incubadas durante 24 h. Após o processo de incubação (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), os compostos foram incorporados à placa para atingir uma concentração final de 100 µg·mL<sup>-1</sup>. Em seguida à inoculação viral, em que as partículas virais foram adicionadas em uma multiplicidade de ensaio (MOI) de 0,1 partículas virais por célula. A concentração final de DMSO nas placas de ensaio foi 0,5% (v/v). As placas foram mantidas por 33 h de incubação (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), sendo, subsequentemente, fixadas com 4% de paraformaldeído (PFA) e submetidas à imunofluorescência indireta como indica o protocolo adiante. Após lavagem duas vezes com PBS pH 7,4, foi realizado o bloqueio das placas com albumina de soro bovino a 5% (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) em PBS (BSA-PBS) por 30 min em temperatura ambiente e lavadas duas vezes com PBS.

O soro de um paciente brasileiro convalescente de Covid-19 diluído 1:500 em PBS ou um anticorpo policlonal de coelho anti-SARS-CoV-2 proteína nucleocapsídica (GeneTex, USA) a 2 µg·mL<sup>-1</sup> em PBS, foram utilizados como um anticorpo primário para detectar a infecção de SARS-CoV-2 em células Vero. Os anticorpos primários foram incubados por 30 min e as placas foram lavadas duas vezes com PBS.

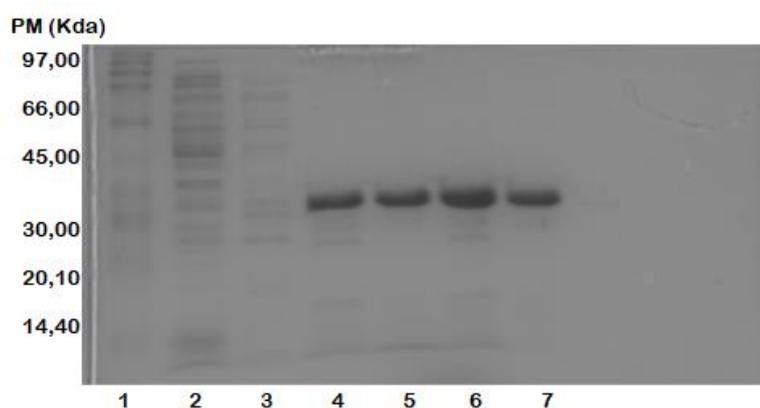
Como anticorpos secundários, foram utilizados anti-IgG humano de cabra marcado com FITC (Chemicon) ou IgG anti-coelho de cabra marcado com Alexa 488 (Thermo Scientific, USA) diluído a 4 µg·mL<sup>-1</sup> em PBS e incubado por 30 min com 5 µg·mL<sup>-1</sup> dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Sigma-Aldrich, USA) em PBS a fim de corar os núcleos.

Foi realizada a lavagem duas vezes com PBS e fotografadas no Operetta High Content Imaging System (Perkin Elmer, USA) utilizando uma objetiva de ampliação de 20x. Quatro imagens foram obtidas por poço. As imagens adquiridas foram analisadas no software Harmony (Perkin Elmer, USA), versão 3.5.2. A análise das imagens consistiu na identificação e contagem de células Vero com base na segmentação nuclear e infecção viral com base na coloração citoplasmática detectada pelo ensaio de imunofluorescência. Os parâmetros medidos em cada um dos poços foram: número total de células e número total de células infectadas. A redução no número de células infectadas indica a porcentagem de atividade antiviral das amostras. A partir dos controles infectado e não infectado, a atividade de cada um dos compostos foi normalizada, assim como a taxa de sobrevivência celular.

## Resultados

### Expressão e purificação de M<sup>pro</sup>

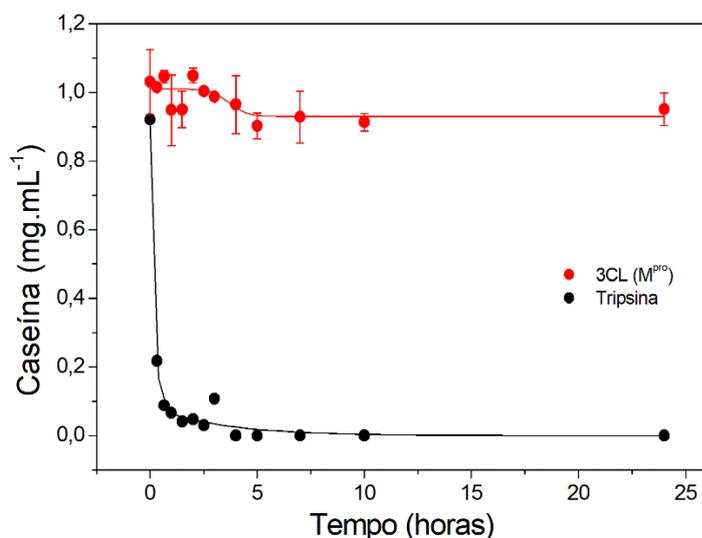
A expressão da proteína foi observada pela análise em SDS-PAGE 12%, através da comparação das bandas obtidas com o peso molecular estimado para a proteína de interesse de 34,9 kDa (Figura 1), predita pela plataforma ProtParam. Foi observado um rendimento satisfatório na produção de M<sup>pro</sup>, tendo como resultado ~2 mL da proteína pura na concentração de 60 – 80 mg em 100 mL de cultura. Em relação à pureza, os resultados foram considerados adequados utilizando a cromatografia de afinidade, não havendo a presença de bandas contaminantes em conjunto com M<sup>pro</sup> após amostra concentrada em tubo de centrifuga Amicon de 30 kDa.



**Figura 1:** SDS-PAGE após purificação da M<sup>pro</sup> para confirmação do tamanho da proteína. (1) Marcador de peso molecular; (2) *Flow Through*; (3) a (6) amostras eluídas em coluna HisTrap 0 a 30% de tampão de eluição; (7) amostra concentrada em tubos de centrifuga Amicon de 30 kDa.

### Especificidade de M<sup>pro</sup>

Os ensaios para avaliação de atividade de M<sup>pro</sup> com substrato genérico evidenciaram a especificidade da protease. Os testes foram realizados com as proteases M<sup>pro</sup> e tripsina, ambas utilizando a caseína como substrato. Quando comparadas, pode-se observar o consumo considerável de caseína pela tripsina, enquanto não houve nenhuma atividade com M<sup>pro</sup>, como mostra a Figura 2. Isso se deve ao fato de que a caseína não possui o sítio específico de clivagem da enzima MCA-AVLQ↓SGFR-Lys-(Dnp)-Lys-NH<sub>2</sub>.

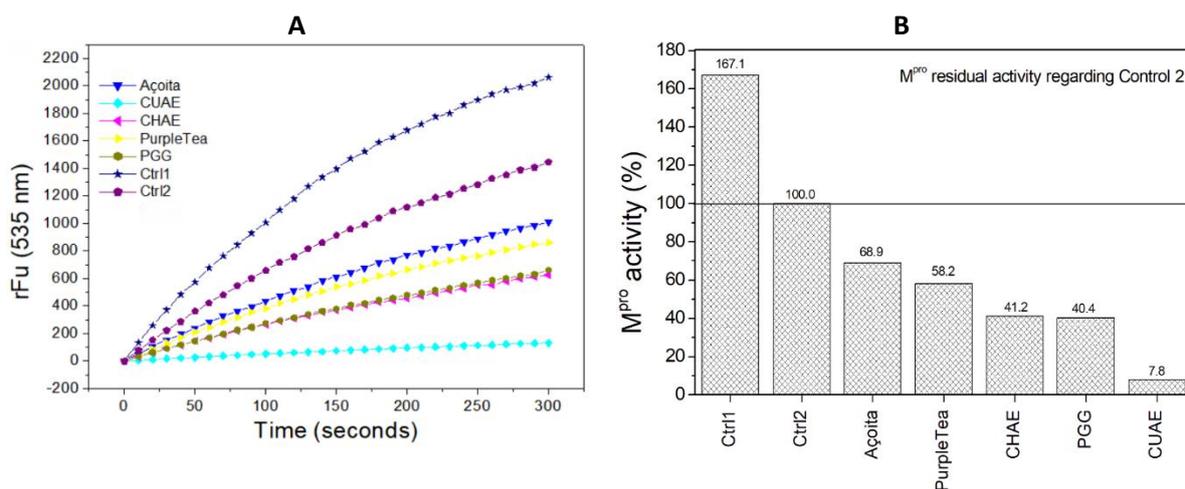


**Figura 2.** Ensaio proteolítico com M<sup>pró</sup> de SARS-CoV-2 (**vermelho**) e tripsina (**preto**) utilizando substrato caseína. Solução de caseína 1% preparada em tampão NaOH 0,01M e Fosfato de Sódio 0,25M. Temperatura 30° C, pH 7,0. A variação no teor de caseína com M<sup>pró</sup> após 3h não foi significativa e é atribuída a oscilações durante a leitura no espectrofotômetro (espalhamento). Cada ponto representa a média dos ensaios realizados em triplicata.

### Prospecção de inibidores de protease de SARS-CoV-2

A atividade inibitória dos extratos CUAE, CHAE, Açoita cavalo, Chá roxo e do composto PGG, foi avaliada em ponto único (Figura 3) e todos na mesma concentração de 43,8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A amostra referente ao Controle 1 da reação não contém nenhum dos compostos testados nem DMSO, sendo a condição com menor interferência possível no estudo. Enquanto no Controle 2, houve adição de DMSO, sem adição de nenhum inibidor, a fim de avaliar se haveria alguma modificação na atividade de M<sup>pró</sup>.

Na Figura 3A nota-se a influência negativa pela redução da emissão de fluorescência causada pela adição de DMSO (diluyente dos compostos). Desse modo, a atividade da protease nos testes com os inibidores foi representada em relação à atividade encontrada no Controle 2; portanto, as velocidades encontradas nos primeiros 30 s de reação para todos os compostos foram normalizadas em relação ao Controle 2 (Figura 3B).



**Figura 3. (A)** Avaliação da inibição da protease M<sup>pro</sup> de SARS-CoV-2 pelos cinco extratos analisados CUAE, CHAE (*Cytinus hypocistis*), Chá Roxo (*Camellia sinensis*), Açoita cavalo (*Luehea divaricata*) e o composto sintetizado PGG (pentagalloyl glucose). Monitoramento dos 300 s do teste em 535 nm. **(B)** Atividade dos cinco compostos testados mais o Controle 1, normalizados em relação ao Controle 2. Tampão de reação 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA. A concentração da enzima foi de 1  $\mu$ M, substrato fluorogênico avaliado na concentração de 10  $\mu$ M e os composto em 43,8  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

O Controle 1 indicou cerca de 60% mais atividade em relação ao Controle 2, evidenciando que o DMSO, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de diminuir a atividade proteolítica de M<sup>pro</sup>. A atividade enzimática é diretamente relacionada ao enovelamento adequado da proteína. O DMSO é um co-solvente muito utilizado para a solubilização de drogas hidrofóbicas, devido sua capacidade de ser miscível em água e na maioria dos líquidos orgânicos, podendo favorecer a exposição de resíduos hidrofóbicos do interior da proteína ao ambiente, refletindo nas interações que estabilizam uma proteína.<sup>39</sup>

Diversos trabalhos que apontam que, mesmo em baixas concentrações, o DMSO é capaz de inibir a atividade de diversas enzimas, incluindo proteases. Descartamos a possibilidade da diminuição da atividade de M<sup>pro</sup> ser causada pela absorção de luz fluorescente pelo DMSO, sendo opticamente inerte nos comprimentos de onda analisados.<sup>39,40,41</sup>

Em relação aos efeitos inibitórios, a substância que apresentou maior atividade inibitória foi o extrato CUAE, inibindo mais de 90% da atividade de M<sup>pro</sup>. Por ter apresentado os melhores resultados na inibição de M<sup>pro</sup>, o extrato de *Cytinus hypocistis* extraído por ultrassom (CUAE) foi selecionado para os ensaios em células Vero infectadas com SARS-CoV-2.

## Ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral em células Vero E6

A concentração de CUAE que causa a redução da viabilidade celular em 50% ( $CC_{50}$ ) quando comparada com o controle de citotoxicidade, assim como a concentração do composto responsável pela inibição de 50% da replicação viral ( $EC_{50}$ ) quando comparada com o controle viral, foram determinadas através da análise da regressão não-linear da curva dose-efeito, através do programa GraphPad Prism 5, conforme mostrado na Figura 4.



**Figura 4.** Resultados dos ensaios de atividade antiviral e citotoxicidade. O índice de seletividade (SI) é determinado pela razão  $CC_{50}/EC_{50}$ .

O composto CUAE obteve 99,6% de inibição da atividade viral quando comparado ao controle. Em relação a citotoxicidade, o composto avaliado apresentou  $CC_{50} > 100,00$  podendo indicar um efeito moderadamente citotóxico às células Vero (Quadro 1), quando em concentrações superiores a 42 vezes a dose terapêutica.<sup>42</sup>

CC <sub>50</sub> µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100	Citotóxico
Entre 101-500	Moderadamente citotóxico
Acima de 500	Não citotóxico

Quadro 1: Interpretação dos resultados de citotoxicidade

O índice de seletividade (SI) do CUAE foi obtido através da razão dos valores de  $CC_{50}/EC_{50}$ . Esse índice é de extrema importância a fim de garantir que, de fato, a inibição de um composto atua sobre o vírus e não decorrente de uma toxicidade sobre as células.<sup>43</sup> O ideal para que um composto possa ser considerado protótipo de um novo fármaco, é que seu índice de seletividade seja maior ou igual a 10.<sup>44</sup> Assim, com um índice de seletividade maior que 40,

o composto CUAE, oriundo de *Cytinus hypocistis*, sugere um potencial candidato seguro ao desenvolvimento de novos fármacos contra SARS-CoV-2.

## Discussão

*Cytinus hypocistis* é uma planta selvagem parasitária caracterizada e conhecida pelos seus altos níveis de taninos, podendo conferir à planta e seus extratos propriedades bioativas e inibitórias enzimáticas.<sup>25</sup>

Os taninos são polifenóis de grande interesse econômico e ecológico. Esses compostos são solúveis em água e possuem peso molecular de 500 a 3000 Dalton, sendo capazes de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides.<sup>46</sup>

A ligação entre taninos e proteínas, possivelmente, acontece através das pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas, conferindo maior estabilidade a estas substâncias.<sup>47</sup>

Muitas pesquisas apontam a atividade biológica dos taninos contra determinados microrganismos, podendo agir como antiinflamatórios e cicatrizantes, e até como inibidores da transcriptase reversa em HIV.<sup>32,46,48</sup> Provavelmente, há dois diferentes modos que os taninos podem exercer seus efeitos biológicos. O primeiro em sua forma inabsorvível como uma estrutura complexa, gerando efeitos antioxidante, antimicrobiano, antiviral, antimutagênico e antinutriente de forma local no trato gastrointestinal, ou na forma absorvível oriundos da fermentação de taninos, podendo produzir efeitos generalizados em vários órgãos.<sup>50</sup>

As aplicações de drogas com taninos têm relação, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Através da precipitação de proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Uma série de bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (0,5 g/L), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido.<sup>47,50</sup>

Devido aos diferentes efeitos dos taninos em proteínas, bem como o fato do ensaio em células ter sido realizado com a adição dos taninos antes da adição do vírus, não podemos afirmar com certeza qual o mecanismo que causou o efeito antiviral observado. É possível que algum dos taninos tenha se ligado na proteína ACE2 da célula vero, ou na proteína *spike* de SARS-CoV-2, de forma a impedir a fusão do vírus com a célula hospedeira. É possível também que um dos taninos do extrato tenha se ligado a M<sup>pro</sup>, como demonstrado pelo efeito inibitório sobre esta enzima neste trabalho.

Chama a atenção o fato de que a composição de taninos do extrato extraído por calor (CHAE) é a mesma do extraído por ultrassom (CUAE), com pequenas variações nas concentrações de cada componente, porém, não chega a ser uma diferença significativa ( $\pm 5\%$ )<sup>25</sup>. Isso sugere que a extração pelo calor possa ter afetado de alguma forma os componentes do extrato em relação a extração por ultrassom, provavelmente por oxidação do componente ativo, o que pode ser a causa da diferença de atividade inibitória da M<sup>pro</sup>, observada na Figura 3.

Uma das complicações da Covid-19 é a chamada tempestade de citocinas, que causa processos inflamatórios generalizados que apresenta melhora após tratamento com antiinflamatórios esteroidais.<sup>51</sup> Os altos níveis de taninos hidrolisáveis presentes em *Cytinus hypocistis* podem contribuir para uma melhora no quadro inflamatório gerado pela Covid 19, visto a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos taninos, poderia reduzir a morbidade e a mortalidade dos casos dessa doença devido sua função na manutenção da homeostase redox.<sup>25,52</sup> Contudo, esta hipótese precisa ser testada por meio de ensaios em modelos de infecção animal. Tratativas para a realização de ensaios neste modelo com o extrato de *Cytinus hypocistis* (CUAE) já foram acertadas com a FioCruz-PR.

De modo geral, os resultados apresentados neste trabalho são considerados promissores, pois evidenciaram um composto capaz de inibir 99,6% da atividade viral em uma linhagem celular. Também foi evidenciada a necessidade de novos estudos a fim de esclarecer o mecanismo de ação do composto vegetal contra a protease viral, separar e identificar as frações de *Cytinus hypocistis*, de modo a concentrar a fração que de fato é responsável pela inibição viral, e diminuir possíveis efeitos tóxicos para efetivamente, no futuro, o extrato de *C. hypocistis* possa ser utilizado como uma opção de tratamento contra a Covid-19.

## **Conclusão**

Os resultados apresentados neste trabalho apontam que o extrato de *Cytinus hypocistis*, extraído pela técnica de ultrassom (CUAE), apresentou atividade antiviral em células Vero infectadas com SARS-CoV-2. A ação dos taninos presentes em *C. hypocistis* tem como efeito a evidente ação antiviral, sugerindo que o extrato seja um possível candidato no desenvolvimento de fármacos fitoterápicos contra a infecção causada por SARS-CoV-2, visto a atual escassez de opções no tratamento dessa doença.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação Araucária (convênio 87/2021). Os autores agradecem a FINEP e ao COMCAP/UEM pelo uso da infraestrutura de pesquisa.

## Referências

1. C. Huang, Y. Wang, X. Li, L. Ren, J. Zhao, Y. Hu, L. Zhang, G. Fan, J. Xu, X. Gu, Z. Cheng, T. Yu, J. Xia, Y. Wei, W. Wu, X. Xie, W. Yin, H. Li, M. Liu, Y. Xiao, H. Gao, L. Guo, J. Xie, G. Wang, R. Jiang, Z. Gao, Q. Jin, J. Wang, B. Cao, Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *Lancet* (London, England). 395 (2020) 497. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
2. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Situation dashboard. World health organization, (2021).
3. P.C. Woo, S.K. Lau, Y. Huang, K.Y. Yuen, Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping, *Experimental Biology and Medicine* 234(10) (2009) 1117-1127.
4. Y. Chen, Q. Liu, D. Guo, Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), (2020), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
5. A.D. Davidson, M.K Williamson, S. Lewis, D. Shoemark, M.W. Carroll, K.J Heesom, M. Zambon, J. Ellis, P.A Lewis, J.A. Hiscox, D.A Matthews, Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 reveals a cell passage induced in-frame deletion of the furin-like cleavage site from the spike glycoprotein, *Genome Medicine*, 12 (68), (2020). Dóí: <https://doi.org/10.1186/s13073-020- 00763>
6. A.A. Naqvi, T. Mohammad, G.M. Hasan, M. Hassan, Advancements in Docking and Molecular Dynamics Simulations Towards Ligand-receptor Interactions and Structure-function Relationships, *Current topics in medicinal chemistry*, 18(20), (2018), 1755–1768. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025114157>
7. X. Peng, X. Xu, Y. Li, L. Cheng, X. Zhou, B. Ren, Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice, *International journal of oral science*, 12(1), (2020) 9. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0075-9>
8. Y.L. Lau, J.S. Peiris, Pathogenesis of severe acute respiratory syndrome, *Current opinion in immunology*, 17(4), (2005). 404–410. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.05.009>
9. H. Zhang, J.M. Penninger, Y. Li, N. Zhong, A.S. Slutsky, Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target, *Intensive care medicine*, 46(4), (2020) 586–590. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
10. Y. He, Y. Zhou, S. Liu, Z. Kou, W. Li, M. Farzan, S. Jiang, Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324 (2004), 773.
11. S.K. Wong, W. Li, M.J. Moore, H. Choe, M. Farzan, A 193-amino acid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 3197-3201.

12. P. Zhou, X.L. Yang, X.-G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, H.-R. Si, Y. Zhu, B. Li, C.-L. Huang, H.-D. Chen, J. Chen, Y. Luo, H. Guo, R.-D. Jiang, M.-Q. Liu, Y. Chen, X.-R. Shen, X. Wang, X.-S. Zheng, K. Zhao, Q.-J. Chen, F. Deng, L.-L. Liu, B. Yan, F.-X. Zhan, Y.-Y. Wang, G.-F. Xiao, Z.-L. Shi, A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature* 2020 579:7798. 579 (2020) 270– 273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
13. D. Wrapp, N. Wang, K.S. Corbett, J.A. Goldsmith, C.-L. Hsieh, O. Abiona, B.S. Graham, J.S. McLellan, Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation, *Science*, 367 (2020) 1260-1263.
14. W. Dai, B. Zhang, X.M. Jiang, H. Su, J. Li, Y. Zhao, X. Xie, Z. Jin, J. Peng, F. Liu, C. Li, Y. Li, F. Bai, H. Wang, X. Cheng, X. Cen, S. Hu, X. Yang, J. Wang, X. Liu, G. Xiao, H. Jiang, Z. Rao, L.K. Zhang, Y. Xu, H. Yang, H. Liu, Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease, *Science*. 368 (2020) 1331–1335. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB4489/SUPPL\\_FILE/PAP.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB4489/SUPPL_FILE/PAP.PDF).
15. J.G. Jesus, C. Sacchi, D. Candido, I.M. Claro, F. Sales, E.R Manuli, D. Silva, T.M. Paiva, M. Pinho, K. Santos, S.C. Hill, R.S. Aguiar, F. Romero, F. Santos, C.R. Gonçalves, M. Timenetsky, J. Quick, J. Croda, W. Oliveira, A. Rambaut, N.R. Faria, Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 62, e30 (2020). <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062030>
16. M.K. Roe, N.A. Junod, A.R. Young, D.C. Beachboard, C.C. Stobart, Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CL<sup>pro</sup>, M<sup>pro</sup>) in the age of COVID-19. *Journal of General Virology*, 102(3):001558. (2021) doi: 10.1099/jgv.0.001558.
17. K. Anand, G.J. Palm, J.R. Mesters, S.G., Siddell, J. Ziebuhr, R. Hilgenfeld, Structure of coronavirus main proteinase reveals combination of a chymotrypsin fold with an extra alpha-helical domain. *The EMBO journal*, 21(13), (2002), 3213–3224. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf327>
18. A. Shamsi , T. Mohammad, S. Anwar , MF AlAjmi , A. Hussain , M. Rehman , A. Islam , M.I. Hassan, Glecaprevir and Maraviroc are high-affinity inhibitors of SARS-CoV-2 main protease: possible implication in COVID-19 therapy, *Bioscience reports*, 40(6), (2020). <https://doi.org/10.1042/BSR20201256>
19. C.A. Lipinski, Drug repurposing, *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 8, (2011) 3–4.
20. Y.Z. Shu, Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective, *Journal of Natural Products*, 61 (1998) 1053-1071.
21. M. Kazemi, A. Eshraghi, A. Yegdaneh, A. Ghannadi, Clinical pharmacognosy”- A new interesting era of pharmacy in the third millennium, *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 20(1), (2012) 18. doi:10.1186/2008-2231-20-18
22. F.M. Macedo, G.T. Martins, C.G. Rodrigues, D.A. Oliveira, Triagem fitoquímica do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville, *Revista Brasileira de Biociências*, 5(2), (2008), 1166-1168.

23. C.G. Kato-Schwartz, A.B. Sá-Nakanishi, A.C. Guidi, G.A. Gonçalves, F.G. Bueno, B.P.M. Zani, J.C.P Mello, P.S.A. Bueno, F.A.V. Seixas, A. Bracht, R.M. Peralta, Carbohydrate digestive enzymes are inhibited by *Poincianella pluviosa* stem bark extract: relevance on type 2 diabetes treatment, *Clinical Phytoscience* 6, 31 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00177-w>
24. T. B. V. Silva, P.A. Castilho, A.B. Sá-Nakanishi, F.A.V. Seixas, M.I. Dias, L. Barros, I. C.F.R. Ferreira, A. Bracht, R. M. Peralta, The inhibitory action of purple tea on in vivo starch digestion compared to other *Camellia sinensis* teas, *Food Research International*, 150(A), (2021). 110781, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110781>.
25. A.R. Silva, J. Pinela, P.A. García, I.C.F.R. Ferreira, L. Barros, *Cytinus hypocistis* (L.) L.: Optimised heat/ultrasound-assisted extraction of tannins by response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, 276 (2021) 119358, ISSN 1383-5866, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119358>.
26. J.C.A. Tanaka, C.C. Silva, B.P. DIAS FILHO, C.V. Nakamura, J.E. Carvalho, M.A. Flogio, Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae), *Química Nova*, 28(5), (2005). 834-837. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000500020>.
27. C.K.S Fioroto, T.B.V. Silva, P.A. Castilho, T.M. Uber, A.B. Sá-Nakanishi, F.A.V. Seixas, R.M. Peralta, A. Bracht, Effects of *Ilex paraguariensis* beverages on in vivo triglyceride and starch absorption in mice, *Biocatalysis and Agricultural, Biotechnology*, 42, (2022), 102330, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102330>.
28. A.L. Sereia, R. Longhini, G.C. Lopes, J.C. Mello, Capillary Electrophoresis as Tool for Diastereomeric Separation in a *Trichilia catigua* Fraction, *Phytochemical analysis: PCA*, 28 3, (2017) 144-150.
29. C.G. Kato-Schwartz, R.C.G. Corrêa, D.S. Lima, A.B. Sá-Nakanishi, G.A. Gonçalves, F.A.V. Seixas, C.W.I. Haminiuk, L. Barros, I.C.F.R. Ferreira, A. Bracht, R.M. Peralta, Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An in vitro, in silico and in vivo study of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$  glucosidase inhibition, *Food Research International*, 137, (2020) ,109462, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109462>.
30. P. Zucca, M. Pintus, G. Manzo, M. Nieddu, D. Steri, A.C. Rinaldi, Antimicrobial, antioxidant and anti-tyrosinase properties of extracts of the Mediterranean parasitic plant *Cytinus hypocistis*, *BMC Research Notes* 8, 562 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1546-5>.
31. A. Ashur, E. Lev, New Genizah documents: three fragments on practical medicine in medieval Egypt, *Ginzei Qedem*, 9 (2013), 9–35.
32. G. Nonaka, I. Nishioka, M. Nishizawa, T. Yamagishi, Y. Kashiwada, G.E. Dutschman, A.J. Bodner, R.E. Kilkuskie, Y.C. Cheng, K.H. Lee, Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte

- cells, *Journal of natural products*, 53(3), (1990), 587–595. <https://doi.org/10.1021/np50069a008>
33. I.J.R. Brunet, M.D. Echevarría, F. M. Luzardo, E. N. Romero, L.M.V. Guerra, J.L.S. Romero, Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea* Morelet, *Revista Cubana de Farmacia*, 37(2), (2003).
  34. O.S. Ajala, A. Jukova, C. Maa, Hepatitis C virus inhibitory hydrolysable tannins from the fruits of *Terminalia chebula*, *Fitoterapia*, 99, (2014), 117–123.
  35. V.M.C. Dantas, K.L. Medeiros, T.K.B. Azevêdo, G.M. Santana, A.V. Pereira, M.B. Gois, M.S.V. Pereira, J.V. Pereira, Taninos: principal componente do extrato *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke inibe o crescimento de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* de origem bovina, *Biotemas*, 29, (2016), 109-114.
  36. C.T.C. Costa, S.M. Morais, C.M.L. Bevilaqua, M.M.C. Souza, F.K.A. Leite, Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 11(2), (2002), 57-60.
  37. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Vols 1,2 and 3 J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2100 pp., soft cover, (n.d.).
  38. U. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685 (1970). <https://doi.org/10.1038/227680a0>
  39. J.J. Modrzyński, J.H. Christensen, K.K. Brandt, Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a co-solvent for toxicity testing of hydrophobic organic compounds, *Ecotoxicology*. 28 (2019) 1136–1141. <https://doi.org/10.1007/S10646-019-02107-0/TABLES/1>
  40. S. Wang, X. Meng, H. Zhou, Y. Liu, F. Secundo, Y. Liu, Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review, *Catalysts* 2016, Vol. 6, Page 32. 6 (2016) 32. <https://doi.org/10.3390/CATAL6020032>.
  41. A. Kumar, T. Darreh-Shori, DMSO: A Mixed-Competitive Inhibitor of Human Acetylcholinesterase, *ACS Chemical Neuroscience*. 8 (2017) 2618–2625. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.7B00344>.
  42. C. Marcovicz, R.C. Ferreira, A.B.S. Santos, A.S. Reyna, C.B. de Araújo, I. Malvestiti, E.H.L. Falcão, Nonlinear optical behavior of two tetrathiafulvalene derivatives in the picosecond regime, *Chemical Physics Letters*. 702 (2018) 16–20. <https://doi.org/10.1016/J.CPLETT.2018.04.053>.
  43. J.V.S. Silva, Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividade Antileishmania de Espécies *Geissospermum* (Apocynaceae). 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.
  44. P. Cos, A.J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, L. Maesa, Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’, *Journal of Ethnopharmacology*, 106, (2006) 290-302.

45. L.D Chiaradia, R.K. Nunes, M. Steindel, R.A. Yunes, Síntese, atividade e seletividade de 2-naftilchalconas em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, *Sociedade Brasileira de Química*, 14(12), (2007) 1.
46. C.M.O. Simões, E.P Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, Editora da Universidade UFRGS, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, (3), (2001).
47. J. Bruneton, *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Editora. Acribia, SA: Espanha, (1991).
48. Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry*, 30, (1991) 3875-3883.
49. E, Haslam, Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action., *Journal of Natural Products*. 59 (1996) 205–215. <https://doi.org/10.1021/np960040+>.
50. H.G. Castro, V.W.D. Casali, L.C.A. Barbosa, P.R. Cecon, Rendimento de tanino em dois acessos de Carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.), em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 1 (1999), 29.
51. J.M. Sanders, M.L. Monogue, T.Z. Jodlowski, J.B. Cutrell, Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review, *Journal of the American Medical Association*, (2020). doi:10.1001/jama.2020.6019
52. M. Goli, Review of novel human  $\beta$ -coronavirus (2019-nCoV or SARS-CoV-2) from the food industry perspective—Appropriate approaches to food production technology, *Food Science & Nutrition*. 8 (2020) 5228. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1892>.

## APENDICE 1

### Sequência de nucleotídeos para inserção no plasmídeo pET22b(+) para expressão da M<sup>pro</sup>

#### PROJECT – SG20.127WB1805

#### == A - Parameters for synthesis ==

- Codon optimization: yes

Host system: *E. coli*

RE to avoid: internal NdeI and XhoI

- Custom cloning: pET22b(+)

- Cloning sites: NdeI - XhoI

#### #1

> NSP5-pET22b

5'-seq: CATATG

```
TCCGGATTCCGCAAGATGGCCTTCCCTTCTGGCAAGGTGGAGGGCTGCATGGTGCAGGTGACCTGCGG
AACCACCACCCTGAACGGTCTGTGGCTGGACGACGTGGTGTACTGCCCCAGGCACGTGATCTGCACCT
CTGAGGACATGCTGAACCCTAACTACGAAGACCTGCTGATCAGAAAGAGCAACCACAACCTTCTGGTG
CAGGCCGGTAACGTGCAGCTGCGTGTGATCGGCCACTCTATGCAGAACTGCGTGCTGAAGCTGAAGGT
GGACACCGCTAACCCCAAGACCCCTAAGTACAAGTTCGTGAGAATCCAGCCTGGTCAGACCTTCTCCG
TGCTGGCCTGCTACAACGGAAGCCCATCCGGCGTGTACCAGTGCCTATGCGTCCCAACTTCACCATC
AAGGGCAGCTTCTGAACGGCTCTTGCGGAAGCGTGGGTTTCAACATCGACTACGACTGCGTGTCTT
CTGCTACATGCACCACATGGAGCTGCCAACTGGAGTGCACGCTGGAAGTACCTGGAGGGTAACCTTCT
ACGGCCCCTTCGTGGACAGACAGACTGCTCAGGCTGCTGGCACCGACACCACCATCACCGTGAACGTG
CTGGCTTGGCTGTACGCCGCTGTGATCAACGGAGACCGCTGGTTCCTGAACAGGTTTACCACCACCCT
GAACGACTTCAACCTGGTGGCTATGAAGTACAACCTACGAGCCTCTGACCCAGGACCACGTGGATATCC
TGGGTCCACTGAGCGCCCAGACTGGAATCGCTGTGCTGGACATGTGCGCCTCCCTGAAGGAAGTCTG
CAGAACGGCATGAACGGACGCACCATCCTGGGATCCGCTCTGCTGGAGGACGAATTCACCCCCTTCGA
CGTGGTGAGGCAGTGCTCTGGTGTGACCTTCCAG
```

3'-seq: CTCGAG

Length: 930 bp