

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA REPLICON REPORTER PARA TRIAGEM
DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE PLANTAS E
PRODUTOS NATURAIS CONTRA SARS-CoV-2**

Por

Heloisa Alves Costa

Belo Horizonte – MG

2023

DISSERTAÇÃO MCS-IRR H.A. COSTA 2023

HELOISA ALVES COSTA

**UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA REPLICON REPORTER PARA TRIAGEM
DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE PLANTAS E
PRODUTOS NATURAIS CONTRA SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientação: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

Belo Horizonte – MG
2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

C823u Costa, Heloisa Alves.
2023

Utilização de um sistema replicon reporter para triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e produtos naturais contra SARS-CoV-2 / Heloisa Alves Costa. – Belo Horizonte, 2023

XIV, 68 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 58-66

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Replicon/farmacologia. 2. Sars-Cov/química. 3. Antivirais/farmacologia. 4. COVID-19/tratamento farmacológico. 5. Produtos naturais / farmacologia. I. Título. II. Oliveira, Jaqueline Germano (Orientação). III. Alves, Tânia Maria de Almeida (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.918

HELOISA ALVES COSTA

**UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA REPLICON REPORTER PARA TRIAGEM
DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE PLANTAS E
PRODUTOS NATURAIS CONTRA SARS-CoV-2**

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (IRR/FIOCRUZ) Orientadora/Presidente

Prof. Dra. Tânia Maria de Almeida Alves (IRR/FIOCRUZ) Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Pedro Augusto Alves (IRR/FIOCRUZ) Titular

Prof. Dra. Vanessa de Andrade Royo (UNIMONTES) Titular

Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 28/02/2023

Dedico esse trabalho à minha mãe maravilhosa Airca, ao Max e a todos os meus queridos familiares e amigos.

"Toda criança começa como um cientista nato. Nós é que tiramos isso delas. Só umas poucas passam pelo sistema com sua admiração e entusiasmo pela ciência intactos."

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a todas as forças que me acompanham e abençoam na vida.

À Airca minha indescritível mãe, pelo amor, carinho, incentivo, sendo meu maior exemplo de esforço, sabedoria e persistência. “Mãe, sem palavras, a senhora é uma rainha”.

Ao Max meu companheiro de todas as horas pela paciência, carinho e por sempre me lembrar do meu propósito.

À minha família e amigos, pelos momentos de alegria e palavras de incentivo.

Anna e Luciana, obrigada por aparecerem para ver se eu estava realmente bem, por segurar minhas mãos e não me deixar pensar em bambear as pernas. Vocês são fortes e me fizeram ficar mais forte.

Às minhas orientadoras Dra. Jaqueline Germano de Oliveira e Dra. Tânia Maria de Almeida Alves, pela paciência, acolhimento, incentivo contínuo e pelo conhecimento transmitido nesses anos.

Agradeço as minhas queridas e fundamentais companheiras, Tamiris e Eliza (respectivas Tami e Eliz, carinhosamente chamadas assim por mim). Sem o auxílio de vocês eu não teria chegado tão bem e confiante ao final dessa etapa. The virologists vocês são especiais.

Dani Nabak, uma grande pessoa, com uma sabedoria e sensibilidade que literalmente me salvaram. Não tenho palavras para te agradecer por tamanha dedicação, ajuda e entusiasmo.

Um agradecimento especial aos meus queridos amigos de laboratório: Emerson, Mariana, Naiara (Time Antivirais), Jacqueline Fiuza e Luciana pela ajuda constante, companheirismo, conversas divertidas e ambiente agradável.

Gratidão aos demais pesquisadores do ICM: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva, Dra. Soraya Gaze, Dra. Érica Alves.

Dra. Kelly Bicalho, a cada conversa nossa pelo corredor, era como se as coisas ficassem mais leves, você sempre foi um anjinho que aparecia para me dizer que tudo ia ficar bem. Te agradeço por cada palavra de incentivo proferida.

Aos colegas da Pós-Graduação.

À Dra. Laura Gil, pelo fornecimento do sistema replicon repórter

À Dra. Paula Rahal e Tamara pelas informações sobre o sistema replicon repórter.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e infraestrutura.

À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos funcionários do IRR que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho, obrigada.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado.

RESUMO

Há necessidade urgente da descoberta de novos compostos antivirais eficazes ampliar o arsenal de medicamentos para o tratamento da COVID-19. Uma das estratégias para a descoberta de fármacos antivirais contra o SARS-CoV-2 é a utilização de sistemas que não utilizam o vírus infeccioso para a triagem de compostos, como os sistemas de replicon repórter. O principal objetivo desse estudo foi implantar, na Fiocruz Minas, um sistema de replicon repórter, denominado BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo expresso em células BHK-21, para ser utilizado como plataforma de triagem de extratos, produtos naturais e sintéticos com atividade contra SARS-CoV-2. Neste sistema repórter, os genes das proteínas estruturais virais spike (S), membrana (M) e envelope (E) do SARS-CoV-2 foram excluídos para evitar a formação de partículas virais infecciosas. Esses genes foram substituídos pelos genes *Gussia luciferase* (GLuc) e resistência à neomicina (Neo), que são expressos constitutivamente pelo sistema repórter. Usando um ensaio de luciferase, observamos que o sinal da luciferase GLuc, expresso em unidades relativas de luminescência (RLU) medido em células BHK-rep-SARS-CoV-2 foi quatro vezes maior quando comparado às células BHK-21 (sem replicon). Essa diferença foi significativa ($p < 0,0012$), porém foi considerada inferior às diferenças relatadas por outros usuários. Para avaliar o desempenho do sistema repórter replicon BHK-rep-SARS-CoV-2 para a triagem de compostos contra SARS-CoV-2, analisamos 27 extratos vegetais e fúngicos e oito produtos naturais, incluindo a licorina, um produto natural, como um controle positivo, uma vez que sua ação antiviral foi descrita contra o vírus infeccioso. Em seguida, a expressão da luciferase GLuc de células BHK-rep-SARS-CoV-2 tratadas por 72 horas com concentrações não tóxicas de extratos selecionados e produtos naturais foi quantificada pelo ensaio de luciferase. Nossos resultados mostraram que a licorina e um extrato do bulbo do *Hippeastrum puniceum* (no qual vários alcaloides inclusive a licorina foram identificados por nosso grupo) foram capazes de reduzir significativamente a expressão da GLuc. No entanto, nossos dados indicaram que há necessidade de adequação de nossas instalações para fornecer melhores leituras do ensaio de luciferase, para que o sistema repórter rep-SARS-CoV-2 GLucNeo possa ser usado satisfatoriamente como uma ferramenta para rastrear a atividade anti-SARS-CoV-2 de bibliotecas de extratos brutos, produtos naturais ou sintéticos.

Palavras-chave: Replicon repórter SARS-CoV-2, COVID-19, Antivirais naturais, Licorina.

ABSTRACT

There is an urgent need for the discovery of new antivirals to expand the arsenal of drugs for the treatment of COVID-19. One of the strategies for antiviral drug discovery against SARS-CoV-2 is the use of systems that can be used under biosafety level 2 conditions do not use the infectious virus to screen compounds, such as reporter replicon systems. The main objective of this study was to implement a reporter replicon system, called BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo expressed in BHK-21 cells, to be used as a screening platform of extracts, natural and synthetic products with activity against SARS-CoV-2, at Fiocruz Minas. In this reporter system, genes of the viral structural proteins spike (S), membrane (M) and envelope (E) of SARS-CoV-2 were excluded to avoid the formation of infectious viral particles. Those genes were replaced by the Gaussia luciferase (GLuc) and neomycin resistance (Neo) genes, which are constitutively expressed by the reporter system. By using a luciferase assay, we observed that the signal of the GLuc luciferase, expressed in relative luminescence units (RLU) measured in BHK-rep-SARS-CoV-2 cells was four times higher when compared to the BHK-21 cells (without replicon). This difference was significant ($p < 0.0012$), however it was considered lower than the ones reported by other users. To assess the performance of the replicon reporter BHK-rep-SARS-CoV-2 system for screening of compounds against SARS-CoV-2, we assayed 27 crude vegetable and fungal extracts and eight natural products, including lycorine, a natural product, as a positive control since its antiviral action has been described against this infectious virus. Then, expression of GLuc luciferase of BHK-rep-SARS-CoV-2 cells treated for 72 hours with distinct nontoxic concentrations of selected extracts and natural products was quantified by luciferase assay. Our results showed that lycorine and a crude extract of the bulb of the *Hippeastrum puniceum* (in which several alkaloids including lycorine were identified by our group) were able to significantly reduce the GLuc signal. However, our data indicated that there is a much needed adequacy of our facility to afford better readings of the luciferase assay so that the rep-SARS-CoV-2 GLucNeo reporter system can be used satisfactorily as a tool for screening the activity of libraries of crude extracts, natural products or synthetic against SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2 reporter replicon, COVID-19, Natural antivirals, Lycorin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da partícula do SARS-CoV-2.....	18
Figura 2. O ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2.....	20
Figura 3. Estratégia de trabalho.....	27
Figura 4. Organização genômica do replicon pRS-CMV-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo.....	28
Figura 5. Avaliação da citotoxicidade de extratos vegetais em células BHK-21 contendo replicon de SARS-CoV-2, células BHK-21 e replicon de CHIKV pelo ensaio do MTT, para triagem.....	39
Figura 6. Avaliação da citotoxicidade de extratos vegetais em células BHK-SARS-CoV-2 Gluc Neo pelo ensaio do MTT	41
Figura 7. Efeito dose-resposta do extrato do fruto da Chamaecrista sp. (EX11279) na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	43
Figura 8. Efeito dose-resposta do extrato da folha da Urvillea sp. (EX11122) na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	44
Figura 9. Efeito dose-resposta do extrato de bulbo de Hippeastrum puniceaum EX17011(A) e EX19365 (B) na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	46
Figura 10. Efeito dose-resposta da harmina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	48
Figura 11. Efeito dose-resposta da reserpina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	49
Figura 12. Efeito dose-resposta da ajmalicina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	50
Figura 13. Efeito dose-resposta da rhoifolina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	51
Figura 14. Efeito dose-resposta da emodina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	53
Figura 15. Efeito dose-resposta da umbeliferona na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.....	53
Figura 16. Efeito dose-resposta da licorina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 GlucNeo.....	54

Figura 17. Efeito dose-resposta do produto natural galato de epigalocatequina na atividade da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo.

.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos brutos fúngicos selecionados	30
Tabela 2. Extratos vegetais selecionados	31
Tabela 3. Produtos naturais (PN) puros selecionados	32
Tabela 4. Triagem da atividade inibitória contra o rep-SARS-CoV-2 de extratos fúngicos	39
Tabela 5. Triagem da atividade inibitória contra o rep-SARS-CoV-2 de extratos vegetais	40
Tabela 6. Concentração máxima não citotóxica (CMNC) de extratos e produtos naturais	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2: Angiotensin Converting Enzyme 2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

BHK: Baby Hamster Kidney - Linhagem celular de rim de hamster recém-nascidos

CE₅₀ : Concentração efetiva 50

CHIKV - Chikungunya virus

CoV- Coronavírus

COVID-19: Coronavirus Disease 2019 - Doença do coronavírus 2019

DENV: Dengue virus

DMV - Double Membrane Vesicle - Vesícula de Membrana Dupla

DMSO: Dimethylsulfoxide - Dimetilsufóxido

ER: Endoplasmic Reticulum - Retículo endoplasmático

ERGIC: Endoplasmic-reticulum Golgi Intermediate Compartment – Retículo endoplasmático-Golgi compartimento intermediário

FDA: Food and Drug Administration

GLuc - Gene da Gaussia luciferase

HAV: Hepatitis A virus - Vírus da Hepatite A

HBV - Hepatitis B virus Vírus da Hepatite B

HCV - Hepatitis C virus Vírus da Hepatite C

HIV: Human Immunodeficiency virus - Vírus da imunodeficiência humana

IRR- Instituto René Rachou

IS - Índice de seletividade

MEM: Minimum Essential Medium- Meio Mínimo Essencial -

MERS: Middle East Respiratory Syndrome - Síndrome respiratória do Oriente Médio

mRNA: Messenger Ribonucleic Acid - Ácido Ribonucleico mensageiro

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio

NB - Nível de segurança biológica

Neo - Neomicina

NS: Non Structural

NSP: Non-Structural Protein - Proteína não estrutural

ORF: Open Reading Frame - Fase de leitura aberta

PN: Produtos Naturais

QPNB: Química de Produtos Naturais Bioativos

RLU: Relative Light Unit - Unidade Relativa de Luz

RNA: Ribonucleic Acid - Ácido Ribonucléico

RpRP: RNA-dependent RNA polymerase - RNA polimerase RNA dependente

RTC: Replication and Transcription Complex - Complexo de replicação e transcrição

SARS-CoV-2: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2

SFB: Soro Fetal Bovino

sp - Espécie

TMPRSS2: Transmembrane serine protease 2 - Serina protease transmembrana 2

UPLC: Ultra Performance/Pressure Liquid Chromatography - Cromatografia líquida de ultra eficiência

YFV: Yellow fever virus - Vírus da Febre Amarela

ZIKV - Zika vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	A COVID-19	16
1.2	O SARS-CoV-2	17
1.3	Ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2	18
1.4	Busca de antivirais contra o SARS-CoV-2	21
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Estratégia de trabalho	27
4.2	Linhagens celulares	27
4.3	Extratos brutos vegetais e fúngicos e produtos naturais puros	29
4.4	Ensaio da luciferase	33
4.5	Ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)	35
4.6	Análises estatísticas	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Implantação do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2-GlucNeo	37
5.2	Triagem da atividade anti-rep-SARS-CoV-2 pelo ensaio da luciferase	38
5.3	Determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos extratos vegetais ativos e dos produtos naturais	40
5.4	Avaliação do efeito dose resposta de extratos vegetais e produtos naturais na expressão da luciferase GLuc do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo	44
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
7	REFERÊNCIAS	58
8	APÊNDICE	67

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A transmissão do SARS-CoV-2, agente etiológico da pandemia da COVID-19, ocorre principalmente através do ar ou do contato com secreções contaminadas (WHO, 2023). A inexistência de vacinas e de medicamentos antivirais para a COVID-19, quando do surgimento do surto da doença na China, foram fatores preponderantes na dispersão do SARS-CoV-2 pelo mundo (Zhu et al., 2020).

Aproximadamente 800 milhões de casos confirmados de COVID-19, que levaram a 6,9 milhões de mortes já foram reportados à Organização Mundial da Saúde (WHO, 2023, acesso em 25/05/2023). Uma ampla gama de estratégias terapêuticas tem sido utilizada para o tratamento da doença incluindo fármacos antivirais, anti-inflamatórios, imunomoduladores e imunoglobulinas (Sanders et al., 2020).

Embora vários fármacos antivirais tenham sido desenvolvidos e utilizados no tratamento de pacientes com COVID-19, a resistência viral a estes medicamentos tem gerado grande preocupação. De fato, o monitoramento da resistência antiviral de novas variantes do SARS-CoV-2 está sendo feito por vários países, inclusive o Brasil, para orientar o uso clínico apropriado de tais medicamentos (ECDC, 2022).

Assim sendo, a ampliação do arsenal de medicamentos antivirais para o tratamento da COVID-19 se faz necessária e urgente. Produtos naturais tais como os produzidos por plantas e fungos, podem ser fontes ricas e promissoras para descoberta de novos compostos com atividade antiviral, que possam servir como base para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença (Sharma et al., 2022).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem trabalhando há mais de uma década na busca de produtos naturais sintetizados por plantas e fungos ou de compostos sintéticos para servir de base para o desenvolvimento de fármacos antivirais para o tratamento de pacientes acometidos por doenças causadas pelo vírus da febre amarela (YFV), vírus da Zika (ZIKV), vírus da dengue (DENV) e vírus da febre Chikungunya (CHIKV) (Barbosa, 2015; Barbosa, 2019; de Castro et al., 2022; Souza, 2023).

1.1 A COVID-19

Ao final de dezembro de 2019 uma doença respiratória foi identificada, em pacientes internados na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China. A princípio, foi observada uma pneumonia grave, porém em seguida a doença foi caracterizada como uma síndrome respiratória aguda (Zhu et al., 2020). O sequenciamento do genoma viral obtido de secreções dos pacientes internados, identificou um novo coronavírus, atualmente denominado SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), cuja sequência nucleotídica é muito similar ao SARS-CoV (Wu et al., 2020) e ao MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) que causa a síndrome aguda do Oriente Médio (Abuo-Rahma et al., 2020).

A doença causada pelo SARS-CoV-2 foi denominada como doença do coronavírus 2019 (Coronavirus Disease 2019) ou COVID-19 (Zhu et al., 2020). A COVID-19 se espalhou rapidamente pelo mundo, sendo um dos principais fatores a transmissão respiratória, considerada a via dominante de disseminação do vírus (Lu et al., 2020).

Cerca de 50% das pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 são assintomáticas, mas ainda assim podem transmitir o vírus. A ocorrência das manifestações clínicas da COVID-19 como febre, cefaleia, tosse, perda do paladar e do olfato, mialgia, fadiga leva em média de 5 a 6 dias após a infecção (McAloon, et al., 2020; Huang et al., 2020; Bai et al., 2020). Entretanto, comorbidades preexistentes como obesidade, diabetes e hipertensão, podem influenciar na evolução da doença, levando a forma mais grave da COVID-19. Assim, várias complicações no quadro clínico dos pacientes, incluindo pneumonia, síndrome do desconforto respiratório agudo, lesão hepática, lesão cardíaca, trombose, acidente vascular cerebral, doença renal, doença neurológica, síndrome inflamatória sistêmica e sepse, podem levar o paciente a óbito. Diante disso, é evidente que a COVID-19 não se trata de uma doença unicamente pulmonar, mas com consequências inflamatórias pulmonares-hematológicas-endoteliais (Hidalgo et al., 2021).

Contudo, perante a gravidade da COVID-19, uma das estratégias prioritárias adotadas para combater o avanço da doença foi a vacinação. De fato, esta estratégia impediu que os números de casos e de óbitos causados pela COVID-19 fossem ainda mais catastróficos visto que até maio de 2023 foram relatados no mundo cerca de 766.895.075 casos confirmados e 6.935.889 mortes. No Brasil foram registrados

37.553.337 de casos confirmados e 702.421 de óbitos por COVID-19 (<https://covid19.who.int/> 25/05/2023).

Até a presente data, várias vacinas foram utilizadas no combate à COVID-19 no Brasil e no mundo, a saber:

(i) a CoronaVac, uma vacina de vírus inativado, isolado da lavagem bronco alveolar de um paciente hospitalizado em Wuhan, China, denominada cepa original. Esta vacina apresentou cerca de 50% de eficácia contra casos moderados e graves da doença (Gao et al., 2020);

(ii) as vacinas Pfizer BioNTech (RNA) da Pfizer e Moderna, a mRNA-1273, contendo RNA da proteína S do SARS-CoV-2. Tais vacinas apresentaram eficácia vacinal cerca de 80% (Polack et al., 2020; Baden et al., 2021);

(iii) a vacina AstraZeneca/Oxford da AstraZeneca, que utiliza um adenovírus de chimpanzé não replicativo como vetor viral, contendo o gene da proteína Spike do SARS-CoV-2. Esta vacina demonstrou eficácia para casos moderados e graves (Brasil, Reino Unido e África do Sul), de cerca de 70% (Voysey et al., 2021; Gordon et al., 2021);

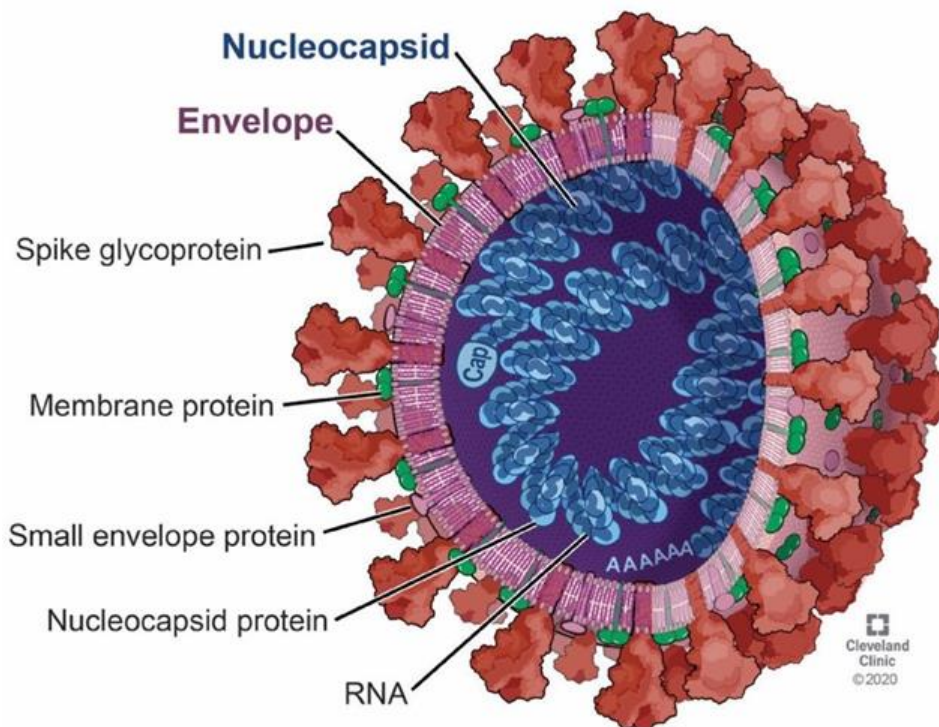
(iv) a vacina Janssen da Johnson & Johnson, utilizou o vetor adenoviral Ad26 contendo o gene Spike, com a adição de um gene que codifica o ativador do plasminogênio tecidual, como adjuvante (Mercado et al., 2021). A sua eficácia para casos moderados e graves foi de 66% na América Latina e de 72% nos Estados Unidos). Satisfatoriamente, estas vacinas mostraram que são eficazes na redução da incidência e gravidade da COVID-19 (Francis et al., 2022; Palacios, 2022).

1.2 O SARS-CoV-2

O genoma do SARS-CoV-2 é composto por RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 30.000 bases os primeiros dois terços do genoma codificam proteínas não estruturais (NS), que geram um complexo replicase-transcriptase (RTC). Este participa da replicação do RNA do genoma e da transcrição subgenômica do mRNA. O terço restante do genoma codifica quatro proteínas estruturais, denominadas proteínas de membrana (M), Nucleocapsídeo (N), Envelope (E), glicoproteína Spike (S), e cinco proteínas não estruturais (NS) NS3, NS6, NS7A, NS7B e NS8. As proteínas estruturais formam as partículas virais e auxiliam na fusão, entrada, montagem e brotamento do vírus (Zhang et al., 2021).

A proteína da espícula (*Spike*) é altamente glicosilada e confere uma das características morfológicas mais marcantes do SARS-CoV-2, que são as projeções no envelope viral que se assemelham a uma coroa (*corona*) ou coroa solar (Zhang et al., 2021). As demais proteínas estruturais E, M e N foram descritas em detalhe no item 2.3. Contudo, a morfologia da partícula do SARS-CoV-2 está ilustrada na figura 1.

Figura 1. Morfologia da partícula do SARS-CoV-2.



Representação das estruturas principais da partícula viral: Nucleocapsídeo, Envelope, glicoproteína Spike, proteína de membrana, proteína pequena do envelope, proteína do Nucleocapsídeo e RNA genômico de fita simples e polaridade positiva. Fonte: Beremann & Silverman. 2020.

1.3 Ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2

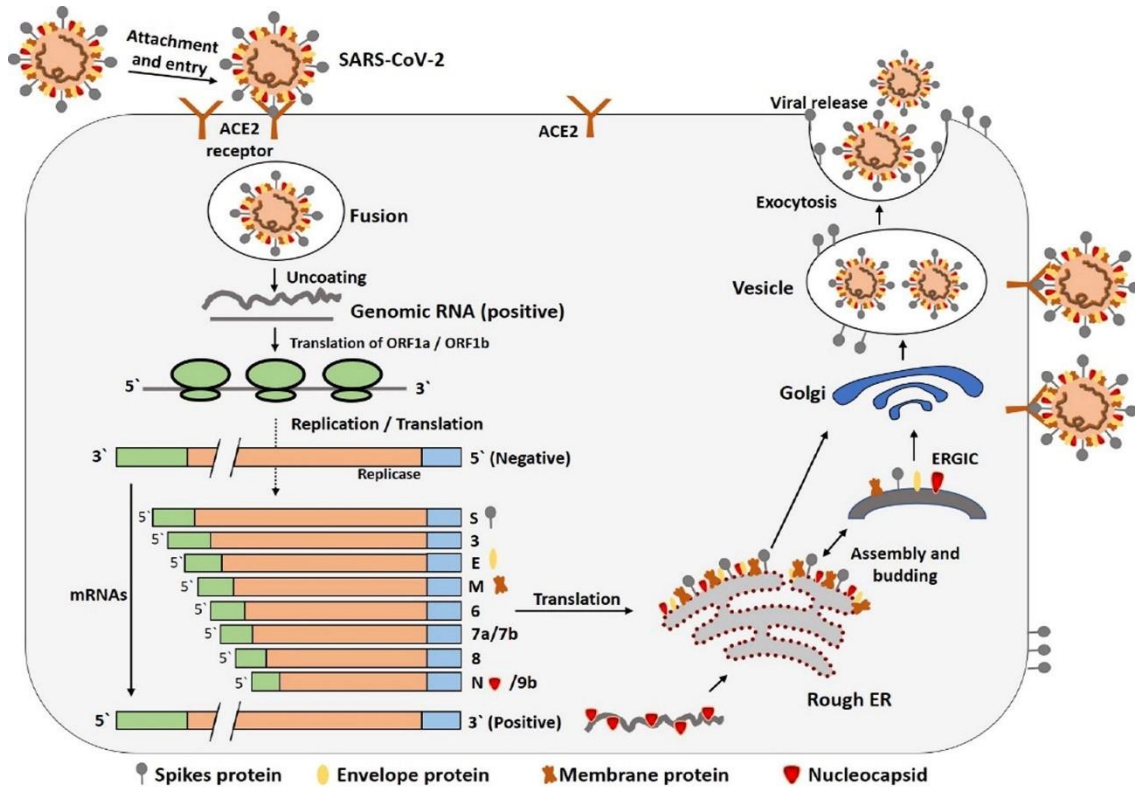
A replicação do SARS-CoV-2 se inicia com a ligação da proteína Spike (S) ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2 ou ACE2) da célula hospedeira. Em seguida ocorre a penetração do vírus, por meio da ativação da proteína S pela Protease Transmembrana Serina 2 (TMPRSS2), permitindo a entrada da partícula viral por endocitose na célula (Wilde et al, 2017). Para o desnudamento do genoma viral, ocorre a fusão do envelope do vírus com a membrana do endossomo, liberando o genoma viral, constituído de RNA fita simples de polaridade

positiva, para a tradução imediata pelos ribossomos da célula hospedeira (Shereen et al., 2020).

Inicialmente as ORF 1a e ORF 1b, que codificam as 16 proteínas não estruturais (NSP) 1-11 e 1-16, são traduzidas gerando as poliproteínas pp1a e pp1b. As NSPs participam da transcrição e tradução do genoma com o auxílio do complexo replicase-transcriptase. As demais ORFs do genoma do SARS-CoV-2 codificam as suas proteínas estruturais, a saber: a proteína do nucleocapsídeo (N); a proteína de membrana (M), a proteína de envelope (E); e a proteína de superfície *Spike* (S), que é o ligante para adesão e penetração viral nas células hospedeiras (Fehr e Perlman, 2015).

No retículo endoplasmático formam-se vesículas de membrana, nas quais o RNA viral é replicado e protegido do sistema imune inato do hospedeiro. A proteína Nsp3 viral cria poros nas vesículas de membrana através dos quais o RNA viral segue para a etapa de montagem do vírion, ou seja, da partícula viral infecciosa. As proteínas estruturais do capsídeo são agregadas a partir da fita do RNA genômico. As partículas virais são transportadas do RE para o aparelho de Golgi e, por sua vez, para a superfície celular através de pequenas vesículas, sendo os vírions liberados, por exocitose, para o exterior da célula infectada (Shereen et al., 2020), como mostrado na figura 2.

Figura 2. O ciclo de multiplicação do SARS-CoV-2.



O ciclo se inicia quando a proteína S do SARS-CoV-2 se liga ao receptor celular ACE2. Após a ligação ao receptor, a mudança de conformação da proteína S facilita a fusão do envelope viral com a membrana celular pela via endossomal permitindo a liberação do RNA genômico do SARS-CoV-2 na célula hospedeira. O RNA do genoma é traduzido nas poliproteínas da replicase viral pp1a e 1ab, que são então clivadas em pequenos produtos por proteinases virais. A polimerase produz uma série de mRNAs subgenômicos por transcrição descontínua que finalmente são traduzidos em proteínas virais. Tais proteínas virais e o RNA do genoma são subsequentemente montados em virions no RE e Golgi e então transportados via vesículas e liberados para fora da célula. ACE2, enzima conversora de angiotensina 2; RE, retículo endoplasmático; ERGIC, compartimento intermediário RE-Golgi. Fonte: Shereen et al., 2020 doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.

Todas as etapas de multiplicação do SARS-CoV-2 infeccioso são passíveis de serem inibidas, entretanto, em sistemas de replicon repórter, nos quais não há formação de partículas virais infecciosas por causa da deleção de genes estruturais essenciais para a formação do vírion, várias etapas do ciclo viral como a adsorção, penetração, montagem e liberação da partícula viral não acontecem. De fato, o efeito antiviral de um determinado composto ou extrato bruto verificada em sistemas de replicon repórter como o empregado neste estudo, pode ser devido à inibição da expressão de genes não-estruturais envolvidos em etapas de regulação e replicação do genoma viral (Krishnan, et al., 2020).

1.4 Busca de antivirais contra o SARS-CoV-2

Além da produção de vacinas, um esforço coordenado sem precedentes foi lançado globalmente para a identificação de medidas terapêuticas contra a COVID-19 (Thorlund et al., 2020). Inicialmente, a maioria dos estudos se concentrou no reposicionamento de fármacos, principalmente dos medicamentos antivirais utilizados para o tratamento da infecção pelo HIV e pelo vírus Ebola (He et al., 2021).

Atualmente, existem poucos medicamentos aprovados para tratamento da COVID-19 (CDC; Anvisa e ECDC), sendo duas preparações de imunoglobulinas (Sotrovimabe; Evusheld® (cilgavimabe + tixagevimabe), um imunomodulador inibidor de Janus kinase (baricitinibe) e três fármacos antivirais, a saber:

(i) remdesivir: inibidor da RNA polimerase RNA dependente (RpRP)

(ii); Paxlovid® (nirmatrelvir + ritonavir): O nirmatrelvir é um inibidor de protease MPro. A função do ritonavir, é inibir o metabolismo do nirmatrelvir permitindo assim o aumento de concentrações plasmáticas do nirmatrelvir.

(iii) Lagevrio® (molnupiravir): análogo de citidina cuja incorporação ao genoma viral causa um acúmulo de erros que inibe a replicação.

Sabe-se que o tratamento com antivirais pode resultar na seleção de variantes virais resistentes e subsequente falha terapêutica. Isso foi amplamente descrito no tratamento de infecções virais (crônicas/persistentes ou agudas) causadas por HIV, vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), herpes vírus e influenza vírus (Ison et al., 2021; Menéndez-Arias et al., 2022). De fato, o monitoramento da resistência antiviral de novas variantes já está sendo feito por vários países, inclusive no Brasil, com o intuito de melhorar o uso clínico apropriado de medicamentos antivirais (ECDC, 2022; Ministério da Saúde, 2023 e CDC, 2023).

O Nirmatrelvir/ritonavir (N/R ou Paxlovid) é um dos medicamentos antivirais mais eficazes contra SARS-CoV-2. Entretanto, dados de grandes repositórios de genomas virais, têm mostrado que mutações na principal protease causadora de resistência a N/R são cada vez mais frequentes. Além disso, foram relatados rebotes virológicos e clínicos após a descontinuação de N/R em pacientes imunocompetentes (Jochmans et al., 2023).

Diante desse cenário, a descoberta de novos antivirais eficazes para a ampliação do arsenal de medicamentos para o tratamento da COVID-19 se faz urgente e necessária.

Os produtos naturais e/ou estruturas de produtos naturais continuam a se destacar pela grande importância na descoberta e no processo de desenvolvimento de fármacos diversos, inclusive os antivirais (Newman e Cragg, 2020). Definem-se como produtos naturais substâncias produzidas pelo metabolismo secundário dos organismos vivos. Tais substâncias que vêm sendo selecionadas pela natureza durante milênios de evolução nas interações dos seres vivos com o meio ambiente. Visto que o Brasil possui uma rica biodiversidade do planeta, uma estratégia promissora é a busca de produtos naturais com propriedade antivirais para desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças causadas por vírus, incluindo vírus emergentes como o SARS-CoV-2.

Uma das estratégias utilizadas para a descoberta de antivirais contra o SARS-CoV-2 é o uso de plataformas de triagem que não utilizam o vírus infeccioso, como os sistemas celulares de replicon repórter de SARS-CoV-2. Replicons são sistemas subgenômicos autorreplicativos nos quais os genes que codificam proteínas estruturais virais são substituídos por um gene repórter como o da enzima luciferase (Fernandes al., 2020).

Dentre as vantagens na utilização de sistemas de replicon repórter similares ao utilizado nesse trabalho é que eles permitem a análise da etapa de replicação do genoma, tradução e síntese de genes virais. Estes sistemas são utilizados como plataformas para triagem de bibliotecas de produtos naturais, compostos sintéticos e extratos brutos, sem a necessidade de manipulação do vírus infeccioso, reduzindo a preocupação com a biossegurança (Xie et al., 2016). Além da biossegurança, o sistema de replicon conta com outras vantagens em relação aos modelos tradicionais baseados em vírus infecciosos, sendo uma delas a habilidade de ser replicado em uma variedade de linhagens celulares, permitindo a avaliação da replicação viral em condições fisiologicamente diversas (Puelles et al., 2020). O uso de plataformas baseadas em replicon repórter foi descrito para triagem de produtos naturais antivirais contra o vírus Chikungunya (CHIKV) (Freire et al., 2022), vírus da febre amarela (YFV) (Lücke et al., 2022), vírus da Zika (ZIKV) (Xie et al., 2016), vírus da dengue 1 e 2 (DENV-1 e DENV-2) (Pang et al., 2001), vírus da hepatite A (HAV) e da hepatite C (HCV) (Sasaki-Tanaka et al., 2022).

Entretanto, uma das desvantagens da utilização de sistemas replicon repórter para triagem de antivirais como o utilizado neste estudo, reside no fato de que não há formação de vírions, as substâncias que inibem e interferem em etapas do ciclo de

multiplicação viral, como adsorção, entrada, desnudamento e montagem da partícula não são detectadas pelo sistema.

Neste estudo foi utilizado sistema de replicon repórter de SARS-CoV-2 denominado replicon pRS-CMV-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo contido em células BHK-21 (descrito em Material e Métodos), para a identificação da atividade antiviral de extratos e produtos naturais contra SARS-CoV-2.

O sistema replicon repórter BHK-rep SARS-CoV-2 GLucNeo codifica o gene da *Gaussia luciferase* (GLuc), introduzido no lugar de genes estruturais do SARS-CoV-2 excluído, para que não haja formação de partícula viral (Fernandes et al., 2020). As luciferases são enzimas que catalisam reações biológicas e transformam a energia química em energia luminosa (luminescente). A *Gaussia luciferase* utilizada nesse estudo, é derivada de copépodo marinho que emite uma luz brilhante ao oxidar seu substrato, a coelenterazina (CTZ) em coelenteramida (Takatsu et al., 2022).

2 JUSTIFICATIVA

Além da busca de vacinas, outra estratégia para o enfrentamento da COVID-19 foi o desenvolvimento de fármacos antivirais para aliviar a carga viral nos pacientes, de forma a permitir que o sistema imune seja capaz de controlar a doença. Apesar de dezenas de substâncias já terem sido descritas como ativas contra o SARS-CoV-2 poucos fármacos antivirais foram aprovados para o tratamento de pacientes com COVID-19. Portanto, a descoberta de substâncias capazes de inibir/diminuir a multiplicação do vírus nos pacientes ainda se faz necessária e urgente.

A busca de antivirais a partir de produtos naturais tem sua base em três aspectos principais: (i) a grande diversidade estrutural de metabólitos secundários, como os produzidos por plantas e fungos; (ii) o tempo de utilização limitado de alguns fármacos para o tratamento de doenças virais, já que o uso prolongado leva à resistência viral; e (iii) a existência de um déficit muito grande de medicamentos novos e eficientes para o tratamento da maioria das doenças causadas por vírus.

Sem dúvida, o Brasil possui uma rica biodiversidade composta por organismos que produzem metabólitos secundários com ação antiviral. Nossa equipe de pesquisa identificou dezenas de extratos fúngicos e vegetais com atividade antiviral *in vitro* contra Dengue vírus (DENV), Zika virus (ZIKV), Chikungunya virus (CHIKV), vírus da febre amarela selvagem (YFV). Além disso, por meio do fracionamento biomonitorado de extratos de plantas da família amarilidácea, *Hippeastrum puniceum* e *H. glaucescens*, identificamos vários PN como a licorina, xilopiranosídeo de narciclasina e pretazetina com atividade antiviral contra ZIKV e DENV-2.

Neste projeto pretendemos implantar e utilizar um sistema de replicon repórter denominado BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo para triagem da atividade antiviral de extratos vegetais e fúngicos, de produtos naturais e substâncias sintéticas contra o SARS-CoV-2. Este sistema consiste em um clone recombinante de células BHK-21 contendo um replicon repórter que pode ser utilizado em laboratórios de pesquisa de nível de segurança biológica 2 (NB2) uma vez que contém o genoma truncado do SARS-CoV-2, do qual foram excluídos os genes de três proteínas estruturais virais S, M e E para evitar a formação de partícula viral infecciosa, sendo substituídos pelos genes da luciferase (GLuc) e da resistência à neomicina (Neo).

A identificação de extratos brutos e produtos naturais capazes de inibir o sistema repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo é feita pelo ensaio da luciferase. Este ensaio

quantifica a luz produzida pela reação enzimática da G-luciferase, expressa de forma constitutiva no sistema replicon repórter, com seu substrato coelenterazina. Uma outra vantagem da utilização deste tipo de sistema de triagem é que somente as amostras consideradas ativas contra o sistema repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo seguem para serem testados *in vitro* contra o SARS-CoV-2 infeccioso, etapa que requer o uso de laboratório com nível de segurança biológico nível 3 (NB-3).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Utilizar o sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo para triagem de atividade antiviral de extratos brutos vegetais e fúngicos, e de produtos naturais. contra SARS-CoV-2.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Implantar e padronizar in loco o sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.

- 2- Determinar a concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos extratos brutos e produtos naturais para o clone 5.2 do sistema replicon BHK-rep-SARS-CoV-2, pelo ensaio do MTT.

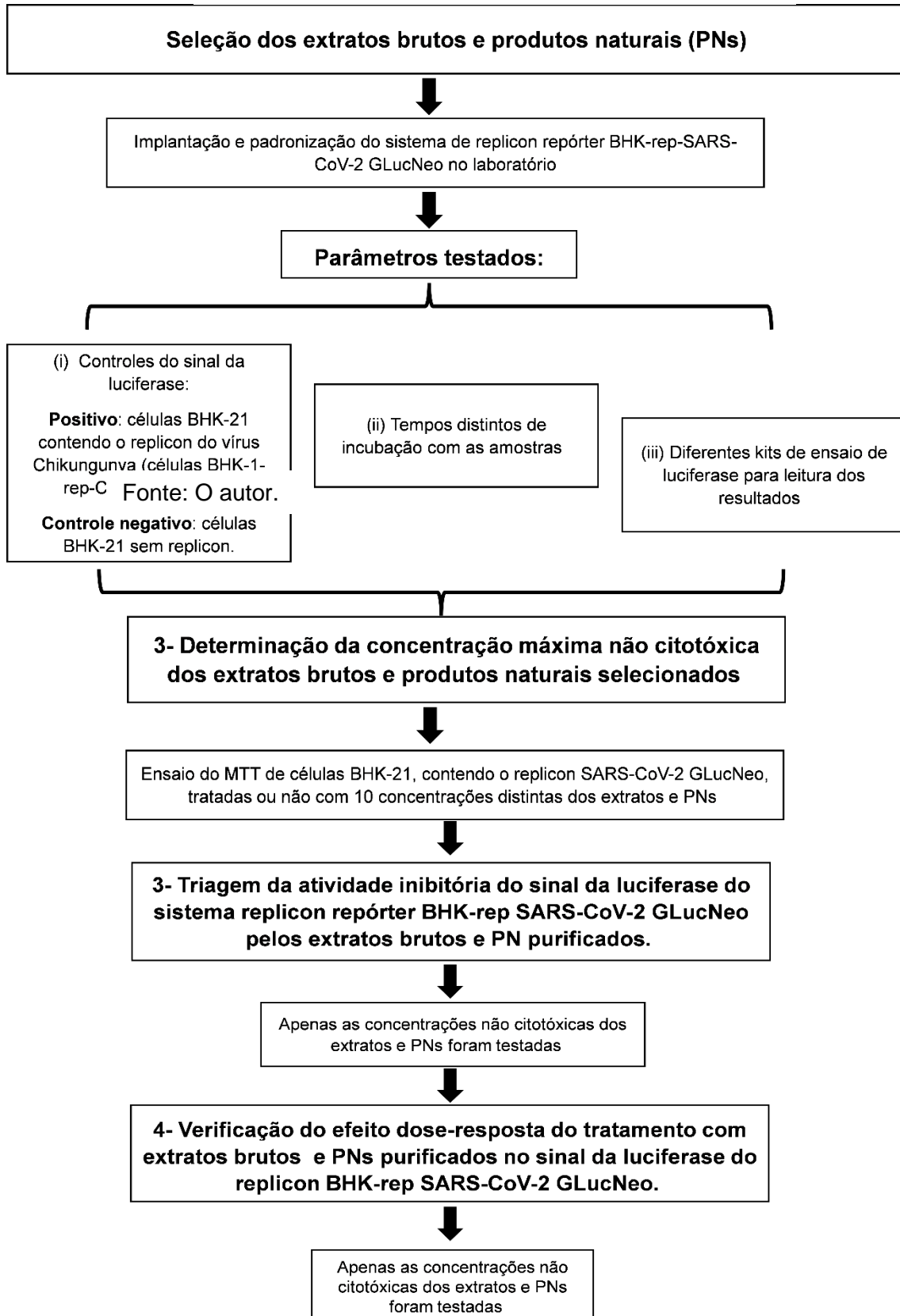
- 3- Triar a atividade inibitória do sinal da luciferase do replicon BHK-rep SARS-CoV-2 GLucNeo pelos extratos vegetais e PN selecionados.

- 4- Avaliar o efeito dose-resposta do tratamento com extratos vegetais e PN purificados no sinal da luciferase do replicon BHK-rep SARS-CoV-2 GLucNeo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia de trabalho

Figura 3 – Estratégia de trabalho elaborado pela autora



4.2 Linhagens celulares

4.2.1 Sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo (clone 5.2).

O sistema replicon repórter do SARS-CoV-2 utilizado neste estudo, denominado BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo, consiste em uma linhagem recombinante de células BHK-21 que expressa de forma constitutiva o replicon pRS-CMV-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo. O sistema foi construído pela Dra. Laura H. V. G. Gil da Fiocruz Pernambuco, que nos forneceu o clone 5.2, na passagem 5.

Como mostrado na figura 3, para a construção deste replicon foram excluídos os genes das proteínas estruturais S, M e E, evitando-se assim, que haja formação de partícula viral. As regiões codificadoras da ORF 1a da ORF1b e do gene N do SARS-CoV-2 foram mantidas. Na região excluída foram introduzidos o gene repórter GLuc (gene da luciferase) e o gene de resistência à neomicina (Neo) (Fernandes et al., 2020).

Figura 4. Organização genômica do replicon pRS-CMV-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo.



A extremidade 5' do replicon contém um promotor do citomegalovírus (CMV) flanqueando as regiões codificadoras dos genes ORF1a, ORF1b e gene N do SARS-CoV-2. Os genes das proteínas estruturais virais S (espícula), membrana (M) e envelope (E) não foram incluídos no construto para que não haja formação de partícula viral. Em seu lugar, foram incluídos os genes GLuc, que codifica a luciferase Gaussia, uma proteína de 20 Kb, derivada do copépodo marinho *Gaussia princeps*; o gene de resistência Neo (neomicina), que codifica para a enzima neomicina fosfotransferase, conferindo resistência a vários antibióticos, incluindo canamicina e G418. Na porção terminal 3' do replicon foi adicionada a sequência RZ, que codifica a ribozima (RZ) do vírus da hepatite delta e a BGH para terminação de transcrição. Fonte: Dra Laura Gil, comunicação pessoal.

O clone 5.2 foi cultivado em *Minimum Essential Medium* (MEM) contendo baixa glicose (Thermo), suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Sigma) a 10%; com solução de penicilina e estreptomicina (100X) (Thermo) para obtenção de concentração final de penicilina a 1000 UI/mL e estreptomicina a 1000 µg/mL e com antibiótico G418 (Geneticina® Thermo) a 5 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e repicadas quando atingiram monocamada celular com 90% de confluência.

4.2.2 Sistema replicon repórter BHK-rep-CHIKV GLucNeo

A linhagem recombinante de células BHK-21 contendo o replicon repórter não infeccioso do vírus CHIKV, denominado **BHK-rep-CHIKV**, foi obtida e gentilmente cedida pela Dra. Laura Gil. Tais células foram cultivadas em meio MEM com baixa glicose suplementado com SFB a 10%; com solução de penicilina e estreptomicina 100X PS (para obtenção de concentração final de penicilina a 1000 UI/mL e estreptomicina a 1000 µg/mL) e com o antibiótico G418 a 5 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até a formação de monocamada com confluência de 90%. Essa linhagem celular foi utilizada como controle positivo do sinal da luciferase nos ensaios antivirais.

4.2.3 Células BHK-21

Esta linhagem celular de fibroblastos derivados de rim de hamster recém-nascido, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi utilizada como controle negativo de luminescência nos ensaios antivirais, uma vez que não alberga replicon repórter. As células foram cultivadas em MEM suplementado com SFB a 10 % e com 1 % de solução 100X PSA (Thermo) para se obter a concentração final de penicilina a 100 UI/mL, estreptomicina a 100 µg/mL e anfotericina B a 0,25 µg/mL. As células foram mantidas em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C e repicadas quando atingiram uma monocamada celular com 90 % de confluência.

4.3 Extratos brutos vegetais e fúngicos e produtos naturais puros

Para este estudo foram selecionados 5 extratos fúngicos, 22 extratos vegetais e 8 produtos naturais (PN) purificados, listados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. Tais extratos foram identificados, pelo nosso grupo de pesquisa, como inibidores da multiplicação *in vitro* de DENV-2, CHIKV e Zika ZIKV (Barbosa, 2019; de Castro et al., 2022).

Os produtos naturais (PN) harmina, licorina, reserpina, ajmalicina, rhoifolina, emodina, umbeliferona, galato de epigallocatequina foram selecionados por apresentarem atividade anti-SARS-CoV-2 descrita na literatura (Adhikari et al., 2020;

Christy et al., 2021) ou contra outros vírus (Atanasov et al., 2021) e por sua disponibilidade na coleção de PN purificados do grupo QPNB.

Os extratos brutos foram preparados e fornecidos pela equipe técnica da Plataforma de Bioprospecção RPT10A, albergada no Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do IRR. As diluições dos extratos vegetais e PN foram preparadas nas concentrações apropriadas para os diferentes ensaios propostos, pela Dra. Mariana Costa Ferreira e pela bióloga Daniela Nabak Bueno Maia.

Tabela 1. Extratos brutos fúngicos selecionados

Família	Gênero	Epíteto	# coleção de cultura UFMGCB	Local de coleta	# EX
Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	6064	Antártica	11513
					17314
		<i>alli-sativi</i>	9451	Antártica	13870
		<i>brevicompactum</i>	9478	Antártica	13897
			9480	Antártica	13899

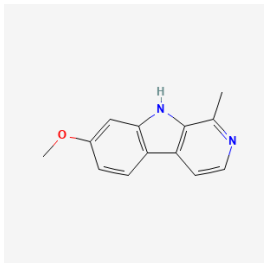
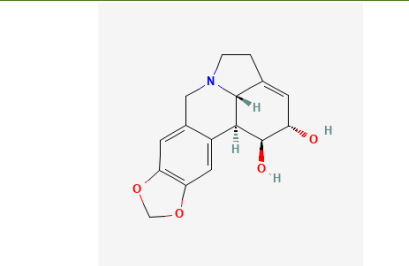
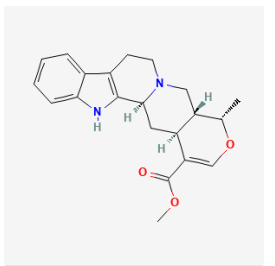
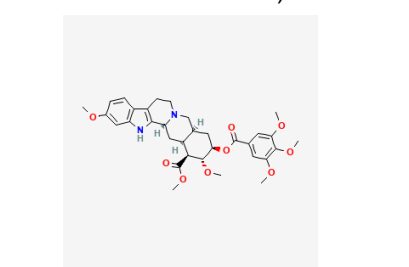
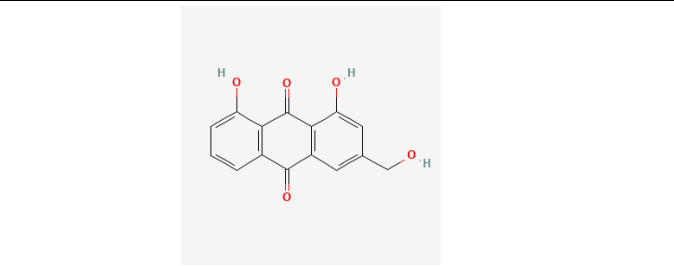
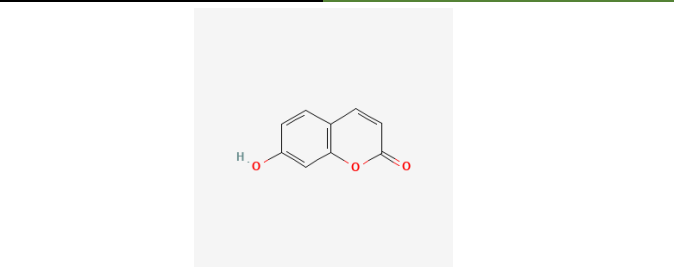
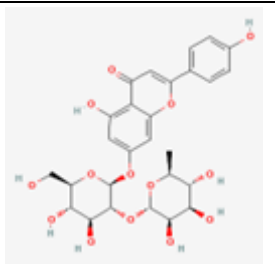
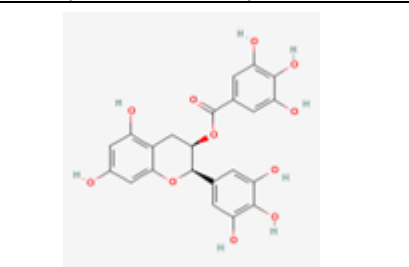
Fonte:O autor.

Tabela 2. Extratos vegetais selecionados

Família	Gênero	Epíteto	# Exsicata	Parte	# EX
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i>	<i>glauscescens</i>	HUFSJ 2914	Flor	13356
				Raiz	13358
		<i>sp</i>	HUFSJ 3007	Raiz	13418
		<i>puniceum</i>	BHZB1206 9	Raiz	17010
				Bulbo	17011
	Flor bulbo		18117 19365		
Asteraceae	<i>Lepidaploa</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 2679	planta inteira	13194
	<i>Chrisolaena</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 2686	Flor	13211
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 2580	caule	13023
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 2193	fruto	11279
				caule	11280
Lythraceae	<i>Diplusodon</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 2210	caule	11321
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 1995	flor e fruto	11115
				caule	11117
		<i>laevifolia</i>	HUFSJ 2201	caule	11298
	<i>Byrsonima</i>	<i>intermedia</i>	HUFSJ 2683	folha	13203
Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	<i>multipunctata</i>	HUFSJ 5905	folha	14691
Rubiaceae	<i>Ixora</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 1999	caule	11129
Sapindaceae	<i>Urvillea</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 1997	folha	11122
	<i>Matayba</i>	<i>junglandifolia</i>	HUFSJ 2587	caule	13039
Verbenaceae	<i>Lantana</i>	<i>sp</i>	HUFSJ 5940	folha	14715

Fonte:O autor.

Tabela 3. Produtos naturais (PN) puros selecionados

classe química PN	fórmula estrutural nome (fabricante # catálogo)	
alcaloide		
	harmina (Roth # 99681)	licorina (BOCSciences, #476288)
-		
	ajmalicina (Roth # 61921)	reserpina (Sigma # R0875)
quinona		
	emodina (Roth #72721)	
cumarina		
	umbeliferona (Roth # 544371)	
flavonoide		
	rhoifolina (Roth # 38551)	(-)-galato de epigalocatequina (Sigma # 4143)

Fonte:O autor.

4.4 Ensaio da luciferase

A detecção da atividade anti-SARS-CoV-2 dos extratos brutos e produtos foi inferida pela inibição dos níveis da expressão da enzima *Gaussia luciferase*, codificada pelo sistema repórter **BHK-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo**, pelo ensaio da luciferase.

Neste estudo foram testados dois sistemas comerciais para o ensaio da luciferase: (i) *Gaussia Luciferase Flash Assay Kit* (# catálogo 1615, Thermo Scientific) utilizado nos ensaios de triagem e nos ensaios para a determinação do efeito dose resposta; (ii) o kit *Renilla-Glo® Luciferase Assay System* (# catálogo E2720, Promega) utilizado em um dos experimentos de efeito dose resposta.

Para os ensaios de luciferase, 1×10^4 de células BHK-21-rep-SARS-CoV-2. células por poço foram semeadas em placa de 96 poços de fundo chato com borda fosca branca (Corning, Costar) em meio qsp 200 µl/poço de MEM contendo soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibióticos, sem adição de G418, seguido de incubação por 24 h para a formação de monocamada celular, com confluência de cerca de 70%. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Como controles foram utilizadas: (i) células BHK-rep-SARS-CoV-2 não tratadas, adicionadas ou não de DMSO a 0,5%, (ii) células BHK-rep-SARS-CoV-2 sem adição de extrato; (iii) células BHK-21-rep-CHIKV não tratadas, utilizadas como controle positivo da reação de luciferase; (iii) células BHK-21 sem replicon, como controle negativo de luminescência.

Nos ensaios de luciferase para triagem da atividade anti-SARS-CoV-2 foi utilizada a dose única de 20 µg/mL de extrato.

Para a revelação do ensaio da luciferase feito com o kit *Gaussia Luciferase Flash Assay*, após 72 h de incubação com as amostras, o meio de cultura da placa com borda fosca foi descartado por inversão e as monocamadas lavadas com 100 µL de PBS. Em seguida, foram adicionados 20 µL por poço da solução de lise fornecida pelo kit, sendo as placas agitadas à temperatura ambiente, por 30 min, em vórtex de placa (NI 1154, Nova Instruments) para obtenção do lisado celular. Após, foram adicionados 50 µL por poço da solução de trabalho recém preparada, contendo coelenterazina (substrato da luciferase) e o tampão *Gaussia Flash Assay Buffer*.

De forma distinta, apenas no sobrenadante celular foi utilizado para quantificação da atividade da luciferase GLuc por meio do kit Renilla-Glo® Luciferase Assay System, que também utiliza coelenterazina como substrato para a luciferase.

A quantificação da luz produzida pela reação da luciferase com o seu substrato foi medida em Unidade Relativa de Luz (RLU) no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em seu módulo luminômetro, utilizando-se os parâmetros de integração de 500 e 1000 RLU nos modos de leitura *top read* e *bottom read*.

Como mencionado, a atividade anti-SARS-CoV-2 de uma amostra é inferida por meio da sua capacidade de inibir a replicação do replicon rep-SARS-CoV-2-GLuc, causando a diminuição do número de cópias do replicon. Uma vez que o número de cópias do replicon influencia diretamente nos níveis de expressão da enzima Gaussia luciferase, a luminescência produzida pela reação da luciferase com seu substrato indicará se a amostra inibiu ou não o replicon. Dessa forma, são comparados os valores de RLU de células rep-SARS-CoV-2 tratadas com extrato/PN, aos valores de RLU de células não tratadas.

Considerou-se que:

- (i) Não houve inibição do replicon quando a média dos valores de RLU de células rep-SARS-CoV-2 tratadas com um extrato/PN foram semelhantes aos das células não tratadas
- (ii) Houve inibição do replicon, quando a média dos valores de RLU de células BHK-SARS-CoV-2 tratadas com um extrato/PN foi significativamente menor do que a média dos valores de RLU verificada nas células não tratadas

Concomitantemente ao ensaio da luciferase, para controle da viabilidade celular, pelo método do MTT, foi preparada uma placa espelho de 96 poços de fundo chato de borda transparente nas mesmas condições empregadas no preparo da placa de borda fosca. O método do MTT está descrito no item 4.5.

Antes de serem testados pelo ensaio da luciferase, os produtos naturais selecionados foram submetidos ao ensaio de MTT para determinação de suas CC_{50} respectivas concentrações não citotóxicas, como descrito no item 5.3.

4. 5 Ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio)

O ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) foi utilizado para a detecção da atividade citotóxica dos extratos e produtos naturais nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 e controles. Neste ensaio, o MTT é convertido em cristais de formazana pelas desidrogenases das mitocôndrias de células viáveis, que quando solubilizados em DMSO exibem coloração azul arroxeada, cuja absorbância é lida por espectroscopia no comprimento de onda de 540 nm (λ_{540} nm).

Esse ensaio foi usado em duas situações específicas:

- (i) para o controle da viabilidade de células após tratamento com extratos /PN testadas pelo ensaio da luciferase,
- (ii) para identificação prévia de concentrações não citotóxicas de extratos e de PN;

Como mencionado anteriormente (item 3.4) nos ensaios de luciferase para triagem e efeito dose resposta de amostras anti-rep-SARS-CoV-2, uma placa espelho de 96 poços de borda transparente foi preparada de forma idêntica à placa de borda fosca, para a verificação da viabilidade celular detectada pelo método do MTT. Assim, após o período de tratamento com os extratos ou PN, o meio de cultura da placa de borda transparente foi descartado e foram adicionados 28 μ L por poço de solução de MTT a 2 mg/ml em DMSO e as células incubadas em estufa CO₂ a 37°C por 90 min. Para a dissolução dos cristais de formazana foram adicionados 130 μ L por poço de DMSO puro (Merck) e as placas agitadas por 5 min em vórtex de placa em baixa velocidade (NI 1154, Nova Instruments). A leitura para determinação da densidade óptica da reação em λ_{540} nm (DO₅₄₀) foi feita no espectrômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices). Os valores de DO₅₄₀ referentes às células tratadas e não tratadas foram comparados para identificação de eventual efeito citotóxico.

Nota: Para facilitar a compreensão, a descrição detalhada dos experimentos utilizando o método do MTT para a verificação da viabilidade celular na triagem antiviral; determinação prévia de citotoxicidade (CC₅₀) e verificação do efeito dose-resposta foi descrita na seção de Resultados e Discussão (item 5).

4.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 8. Para todos os dados foi aplicado previamente o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. O teste Two-way ANOVA seguido de comparações múltiplas de Sidak foram usados para analisar os dados paramétricos. Já para dados não-paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando P-valor menor que 0,05 e alguns casos menor que 0,01.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Implantação do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2-GlucNeo

A implantação do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2-GlucNeo para triagem de atividade antiviral de extratos vegetais e fúngicos e produtos naturais puros contra o SARS-CoV-2 demandou vários meses. Nesta etapa foram utilizadas cerca de 800 reações dos kits para o ensaio da luciferase que corresponderam a cerca de 80% dos reagentes adquiridos para a execução do projeto. Infelizmente, valores de RLU não adequados foram repetidamente obtidos quando o protocolo padrão do ensaio de luciferase recomendado pelos nossos colaboradores e pelo fabricante foi adotado.

Na tentativa de implantação do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2, várias modificações no protocolo do ensaio da luciferase foram testadas, tais como: uso de placa de borda fosca branca e borda fosca preta; inclusão da linhagem BHK-21 contendo o replicon repórter do vírus Chikungunya como controle positivo de luminescência, uso do kit Renilla-Glo® Luciferase Assay System; realização de leituras do sinal de luminescência em diferentes parâmetros de integração e o aumento do tempo de tratamento com os extratos e PN de 48 h para 72 h.

Assim, foi constatado que o fator crucial para a obtenção de valores apropriados de sinal de luminescência produzido pela Gluc foi tempo de incubação por 72 horas após tratamento com os extratos ou PN. Desta maneira, foram obtidos valores de RLU aceitáveis, mas não ideais.

A diferença entre os valores de RLU obtidos a partir de células rep-SARS-CoV-2 não tratadas e de células BHK-21 sem replicon, no tempo de 72 h, foi de 4 vezes. Esta diferença foi considerada muito baixa, quando comparada às diferenças de 10 a 20 vezes observadas por outros usuários do sistema (Dra. Laura Gil, Fiocruz Pernambuco e Dra. Paula Rahal, Unifesp, são José do Rio Preto; comunicação pessoal). Além disso, reações de luciferase utilizando o sistema replicon do vírus Chikungunya em BHK-21, denominado BHK-rep-CHIKV-CoV-2 GLucNeo, verificamos uma diferença de apenas 20 vezes entre os valores de RLU de células não tratadas e células BHK-21 sem replicon, aos passos que nos laboratórios dos nossos colaboradores foi verificada uma diferença de cerca de 100 vezes. Tal diferença pode

ser devido a utilização de luminômetros com injetores de amostras na Fiocruz Pernambuco (Glomax, Promega) e na Unifesp, ao contrário do luminômetro (Spectramax M5, Molecular Devices) utilizado por nós, que não dispõe de injetores de reagentes. Sabe-se que a utilização de injetores de amostras potencializa a detecção do sinal de luminescência, possibilitando captação da reação de curta duração, que emite um sinal muito intenso de brilho por um período curto, ou seja, por poucos segundos.

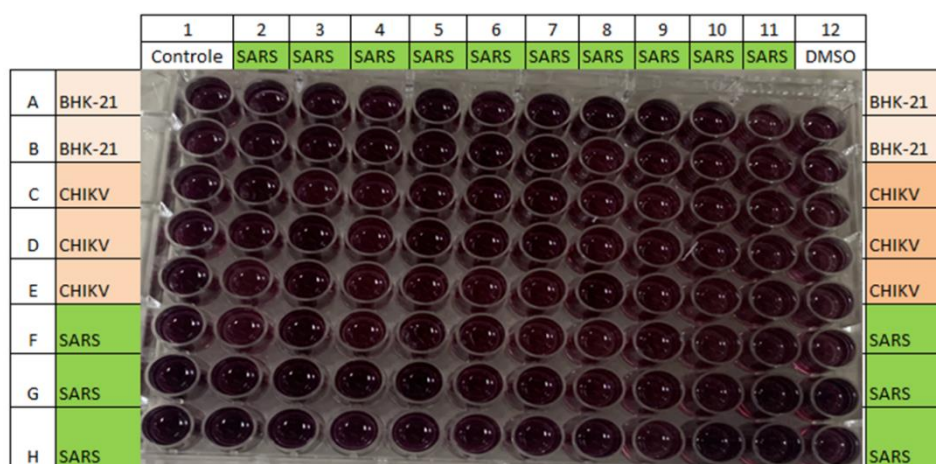
Todavia, apesar de pequena, a diferença de 4 vezes foi significativa ($p < 0,0012$). Assim sendo, prosseguimos para as etapas de triagem antiviral de extratos e PN utilizando o sistema repórter BHK-rep-SARS-CoV-2.

5.2 Triagem da atividade anti-rep-SARS-CoV-2 pelo ensaio da luciferase

Na etapa de triagem da atividade anti-rep-SARS-CoV-2, foram testados 27 extratos brutos, sendo 22 derivados de plantas e 5 derivados de fungos, na concentração única de 20 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata, pelo ensaio da luciferase utilizando-se o kit Gaussia Luciferase Flash Assay Kit, catálogo 16158 16159. Estes extratos foram selecionados visto que foram capazes de proteger células Vero contra a multiplicação de DENV-2, ZIKV e/ou CHIKV, em estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Barbosa, 2019; de Castro et al., 2022).

Nenhum dos extratos brutos foi citotóxico para células BHK-21 contendo o replicon de SARS-CoV-2, na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, quando avaliados pelo ensaio do MTT, como mostrado na figura 5.

Figura 5. Avaliação da citotoxicidade de extratos vegetais em células BHK-21 contendo replicon de SARS-CoV-2, células BHK-21 e replicon de CHIKV pelo ensaio do MTT, para triagem.



Placa representativa da coloração pelo MTT para determinação da viabilidade de células BHK-21-rep-SARS-CoV-2, BHK-21 e CHIKV não tratadas, adicionadas (coluna 12) ou não (coluna 1) meio de cultura contendo 0,5% de DMSO e tratadas por 72 h na concentração 20 µg/mL (colunas 2 a 11) de 27 extratos vegetais, em triplicata. A quantificação da viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT foi feita como descrito em Material e Métodos (item 4). Fonte: O autor.

Na triagem pelo ensaio da luciferase foram considerados ativos contra o replicon de SARS-CoV-2 os extratos que promoveram 50% de redução da do sinal da luciferase das células BHK-21 contendo replicon de SARS-CoV-2, em relação ao controle de células não tratadas. Assim sendo, dois extratos obtidos do fungo *Penicillium chrysogenum* (Ex11513 e Ex17314) e um extrato do fungo *P. brevicompactum* (Ex13899) foram ativos. Dentre os extratos vegetais considerados como ativos o Ex17010, derivado da raiz de *Hippeastrum puniceum*; e o Ex11279 de fruto de *Chamaecrista* sp.

Tabela 4. Triagem da atividade inibitória contra o rep-SARS-CoV-2 de extratos fúngicos

Gênero	Epíteto	# EX	Inibição do rep-SARS-CoV-2
<i>Penicillium</i>	<i>chrysogenum</i>	11513	Sim
		17314	Sim
	<i>alli-sativi</i>	13870	Não
	<i>brevicompactum</i>	13897	Não
		13899	Sim

Fonte: O autor.

Tabela 5. Triagem da atividade inibitória contra o rep-SARS-CoV-2 de extratos vegetais

Gênero	Epíteto	Parte	# Ex	Inibição do rep-SARS-CoV-2
<i>Hippeastrum</i>	<i>glauscenscens</i>	flor	13356	não
		raiz	13358	não
	<i>sp</i>	raiz	13418	não
	<i>puniceum</i>	raiz	17010	sim
		bulbo	17011	não
		flor	18117	não
		bulbo	19365	NT
<i>Lepidaploa</i>	<i>sp</i>	planta inteira	13194	não
<i>Chrisolaena</i>	<i>sp</i>	flor	13211	não
<i>Erythroxylum</i>	<i>p</i>	caule	13023	não
<i>Chamaecrista</i>	<i>sp</i>	fruto	11279	sim
		caule	11280	não
<i>Diplusodon</i>	<i>sp</i>	caule	11321	não
<i>Banisteriopsis</i>	<i>sp</i>	flor e fruto	11115	não
		caule	11117	não
	<i>laevifolia</i>	caule	11298	não
<i>Byrsonima</i>	<i>intermedia</i>	folha	13203	não
<i>Myrcia</i>	<i>multipunctata</i>	folha	14691	não
<i>Ixora</i>	<i>sp</i>	caule	11129	não
<i>Urvillea</i>	<i>sp</i>	folha	11122	não
<i>Matayba</i>	<i>junglandifolia</i>	caule	13039	não
<i>Lantana</i>	<i>sp</i>	folha	14715	não

NT: não testado, o extrato 19365 não foi testado na etapa de triagem. Fonte: O autor.

5.3 Determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos extratos vegetais ativos e dos produtos naturais









A determinação da concentração máxima não citotóxica (CMNC) dos extratos vegetais ativos e dos oito PN selecionados para o sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 Gluc Neo foi feita pelo método do MTT. Tal estratégia foi empregada de modo que apenas concentrações não citotóxicas fossem testadas nos ensaios de luciferase para a avaliação do efeito dose-resposta dos extratos e PN na replicação do rep-SARS-CoV-2, cujo resultado está descrito no item 5.4.

Além dos extratos Ex17010 de raiz de *Hippeastrum puniceum*, e do Ex11279 de fruto de *Chamaecrista* sp., foram testados outros cinco extratos vegetais, a saber: Ex19365 obtido da coleta do bulbo de *Hippeastrum puniceum*, Ex17011 do bulbo *H.*

puniceum, Ex11129 de caule de *Ixora* sp., Ex14715 de folha de *Lantana* sp. e Ex11122 de folha de *Urvillea* sp. Estes cinco extratos foram incluídos porque apresentaram índices de seletividade (IS) significativos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV, em células Vero, como descrito por Barbosa (2019) e de Castro colaboradores (2022).

A figura 6 ilustra a coloração pelo MTT de uma placa de 96 poços com células BHK-21-rep-SARS-CoV-2 tratadas ou não com 10 concentrações distintas concentrações das amostras.

Figura 6. Avaliação da citotoxicidade de extratos vegetais em células BHK-SARS-CoV-2 Gluc Neo pelo ensaio do MTT.

Placa A		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EXTRATOS BRUTOS		CONCENTRAÇÕES (µg/ml)											
		CC	0,2	0,4	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25	50	100	CC + DMSO
A	11279 – <i>Chamaecrista</i> sp. – fruto												
B	11298 – <i>Banisteriopsis leevifolia</i> – caule												
C	17010 – <i>Hippeastrum puniceum</i> – raiz												
D	17011 – <i>Hippeastrum puniceum</i> – bulbo												
E	11129 – <i>Ixora</i> sp. – caule												
F	14715 – <i>Lantana</i> sp. – folha												
G	19385 – <i>Hippeastrum puniceum</i> – bulbo – recoleta												
H	11122 – <i>Urvillea</i> sp. – folha												

Placa representativa da coloração pelo MTT para determinação da viabilidade de células BHK-21-rep-SARS-CoV-2, não tratadas, adicionadas (coluna 12) ou não (coluna 1) meio de cultura contendo 0,5% de DMSO e tratadas por 72 h com diferentes concentrações (100, 50, 25, 12,5; 6,3; 3,1; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 µg/mL (colunas 2 a 11) de oito extratos vegetais. A coloração pelo MTT foi feita como descrito em Material e Métodos (item 4). Fonte: O autor.

Os valores de CMNC dos extratos vegetais e PN (harmina, licorina, reserpina, ajmalicina, rhoifolina, emodina, umbeliferona, galato de epigallocatequina) estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração máxima não citotóxica (CMNC) de extratos e produtos naturais

Amostras	CMNC*
Ex17010 - <i>Hippeastrum puniceum</i> – Raiz	25
Ex17011 - <i>Hippeastrum puniceum</i> – Bulbo	25
Ex19365 - <i>Hippeastrum puniceum</i> – Bulbo	25
Ex11279 - <i>Chamaecrista</i> sp.- fruto	25
Reserpina	>50 μ M
Ajmalicina	>50 μ M
Rhoifolina	>50 μ M
Emodina	>50 μ M
Umbeliferona	>50 μ M
Harmina	25 μ M
Licorina	25 μ M
Galato de epigallocatequina	6,3 μ M

Valores de CMNC expressos em μ g/mL para os extratos vegetais e em μ M para os produtos naturais. Fonte: O autor.

5.4 Avaliação do efeito dose resposta de extratos vegetais e produtos naturais na expressão da luciferase GLuc do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo

É preciso mencionar que alguns fatores prejudicaram sobremaneira a avaliação da atividade inibitória dos extratos e produtos naturais contra SARS-CoV-2 que é inferida pela diminuição da luminescência produzida pela reação da GLuc, expressa de forma constitutiva, em células BHK-21 contendo o replicon repórter rep-SARS-CoV-2 GLucNeo, a saber:

- (i) a modesta razão (valor aproximado de 4), entre os valores de luminescência expressos em RLU verificados em células BHK-rep-SARS-CoV-2 não tratadas quando comparados aos valores verificados em células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle residual de luminescência, provavelmente devido ao uso de luminômetro sem injetores para a leitura dos ensaios da luciferase;
- (ii) o experimento para avaliação do efeito dose resposta das amostras foi feito apenas uma vez, por causa da indisponibilidade de reações para o ensaio da luciferase, o que gerou um alto desvio padrão entre valores de RLU obtidos. Em outras palavras, os valores de RLU obtidos para algumas concentrações das amostras de extratos e PN testadas para a avaliação do efeito dose resposta não foram significativos ($p > 0,05$)

por causa do alto desvio padrão verificado nas leituras de luminescência pelo ensaio da luciferase.

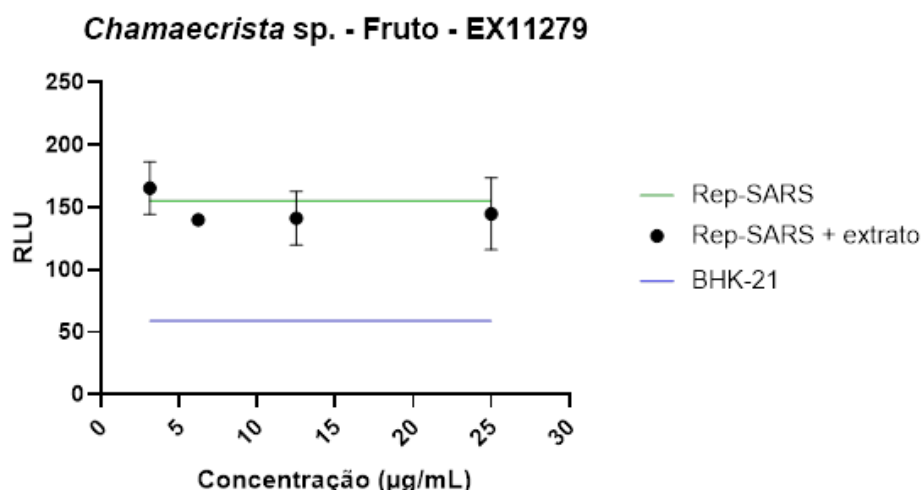
Além disso, sabe-se que alguns inibidores da replicação viral podem diminuir atividade enzimática da luciferase *per se*, portanto, nesse caso, a perda de sinal pode sugerir falsos positivos (Heitman et al., 2008).

Enfim, a confirmação da atividade inibitória contra rep-SARS-CoV-2 das amostras testadas, necessariamente será feita posteriormente. Todavia, alguns extratos brutos e produtos naturais parecem ser promissores, como apresentado a seguir.

5.4.1 Ex11279 – Fruto de *Chamaecrista* sp.

No ensaio do efeito dose resposta do extrato do fruto de *Chamaecrista* sp. (Ex11279) não foi verificado a redução da expressão da luciferase GLuc do sistema repórter do replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2, nas concentrações de 25, 12,5; 6,2 e 3,1 $\mu\text{g/mL}$ (figura 7), indicando que este extrato não foi ativo contra o replicon repórter.

Figura 7. Efeito dose-resposta do extrato do fruto da *Chamaecrista* sp. (EX11279) na expressão da luciferase do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células, em triplicata, tratadas por 72 h, com as doses de 25, 12,5; 6,2 e 3,1 $\mu\text{g/mL}$ do extrato EX11279 foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

O extrato EX11279 do fruto de *Chamaecrista* sp. foi ativo contra DENV-2 e ZIKV com CE_{50} contra DENV de 3 $\mu\text{g/mL}$ e contra ZIKV de 54 $\mu\text{g/mL}$, com respectivos IS

de 12 e > 2. Além disso, este extrato se mostrou ativo contra o CHIKV na concentração de 20 µg/mL (Barbosa, 2019; de Castro et al., 2022).

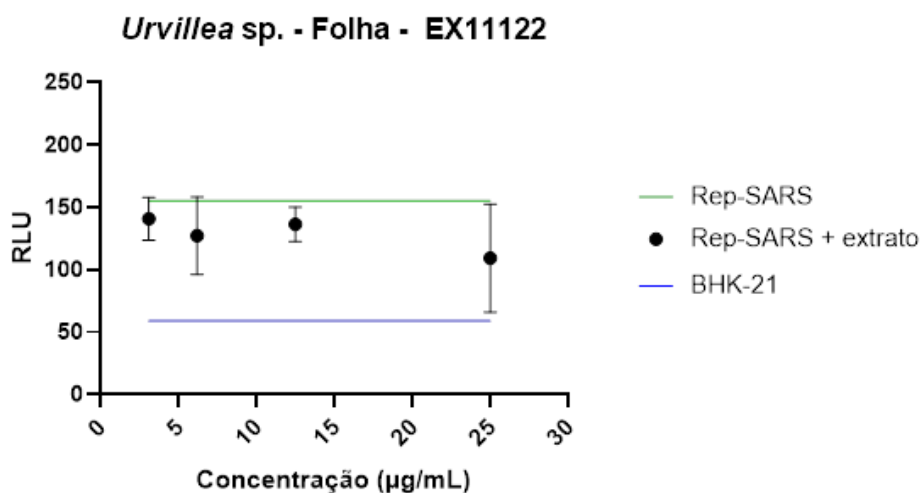
A atividade antiviral *in vitro* de extratos de plantas do gênero *Chamaecrista* (Fabaceae), como a *Chamaecrista nictitans* já foi descrita contra o herpesvírus simplex (HSV) em células Vero, onde foi observada a inibição da fixação do vírus à célula e da etapa de transcrição secundária do genoma viral. A caracterização química deste extrato mostrou a presença de taninos (Herrero-Urbe et al., 2004; Mateos-Martín et al., 2014).

Todavia, a sua ação anti-SARS-CoV-2 ainda não foi descrita.

5.4.4 EX11122 - Folha de *Urvillea* sp.

O tratamento de células BHK-rep-SARS-CoV-2 por 72 horas com 12,5; 6,2 e 3,1 µg/mL extrato de folha de *Urvillea* sp. (Sapindaceae) (Ex11122) não reduziu a expressão da luciferase do sistema de replicon repórter (figura 8), indicando que este extrato não foi ativo contra sistema de replicon repórter. Este extrato foi ativo contra DENV-2 e CHIKV na etapa de triagem utilizando-se 20 µg/mL de extrato. Por outro lado, o extrato de caule (EX11123) desta mesma planta foi ativo contra ZIKV e DENV, porém ainda não foi testado contra CHIKV (Barbosa, 2019).

Figura 8. Efeito dose-resposta do extrato da folha da *Urvillea* sp. (EX11122) na expressão da luciferase do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 25, 12,5; 6,2 e 3,1 µg/mL do extrato foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do

sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência.

Fonte: O autor.

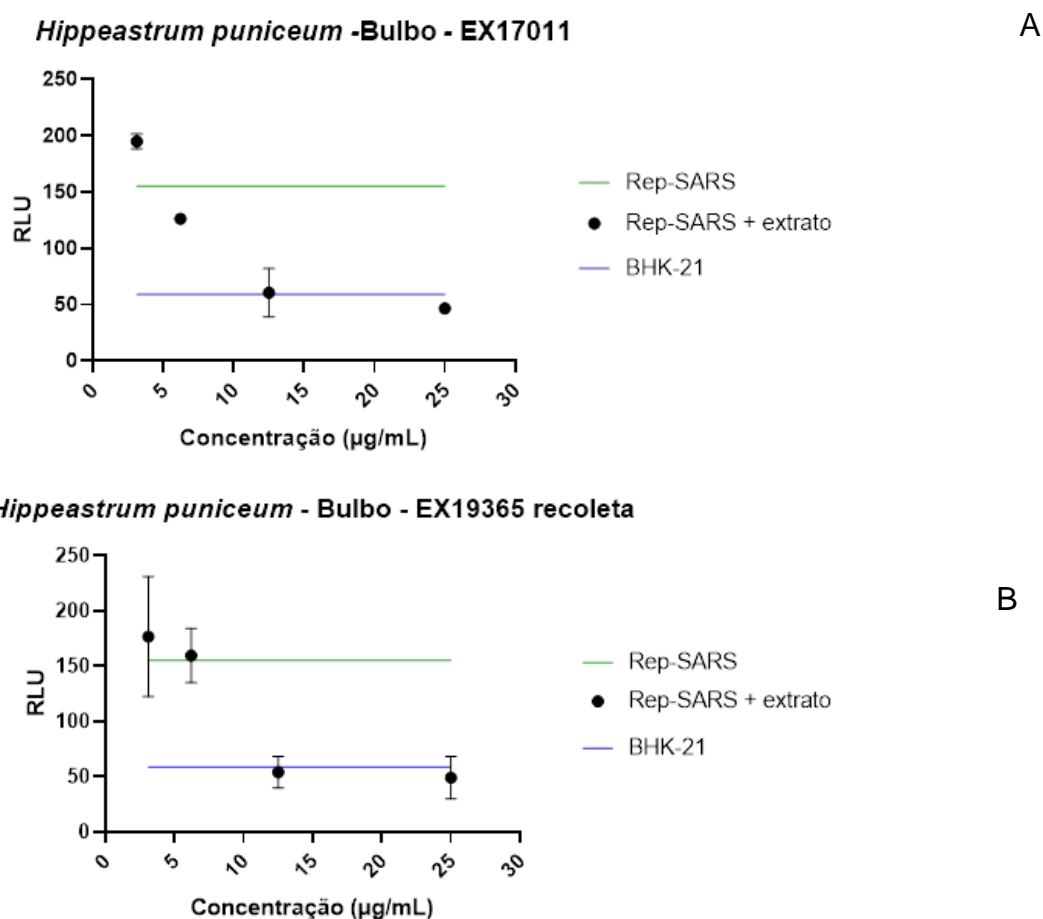
Até o momento, a atividade antiviral de plantas do gênero *Urvillea* ainda não foi demonstrada para outros vírus.

Um dos poucos relatos sobre atividade biológica desta planta foi feito por Nirma e colaboradores (2019) que demonstraram que o flavonoide, tricetina-4'-O-metil flavona, identificado em extratos de *Urvillea rufescens* é um potente inibidor da atividade da nucleosídeo hidrolase de *Leishmania donovani*.

5.4.5 EX17011 e EX19365 – Bulbo de *Hippeastrum puniceum*

Ambos os extratos de bulbo de *Hippeastrum puniceum* inibiram, de forma significativa, a atividade da luciferase nas células BHK-rep SARS-CoV-2 nas concentrações não tóxicas de 25 µg/mL e 12,5 µg/mL (Figura 9). Os valores de p obtidos para ambos os extratos neste experimento estão mostrados na tabela A1 do Apêndice.

Figura 9. Efeito dose-resposta do extrato de bulbo de *Hippeastrum puniceum* EX17011(A) e EX19365 (B) no sinal da luciferase do replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses não citotóxicas de 25, 12,5; 6,2 e 3,1 µg/mL do extrato foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

Nosso grupo de pesquisa verificou que estes extratos inibiram a multiplicação de DENV-2 e ZIKV em células BHK-21 e células Vero, respectivamente. Por meio do fracionamento biomonitorado, por cromatografia de ultra alta resolução acoplada a espectrometria de massas destes extratos várias substâncias que foram ativas contra o DENV-2 e ZIKV, como a licorina, pretazetina, narciclasina e narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo. Além disso, por meio da espectrometria de massas destes extratos foram detectadas, mas ainda não identificadas, várias outras substâncias cuja atividade antiviral será testada por nós (Barbosa, 2019; de Castro et al., 2022).

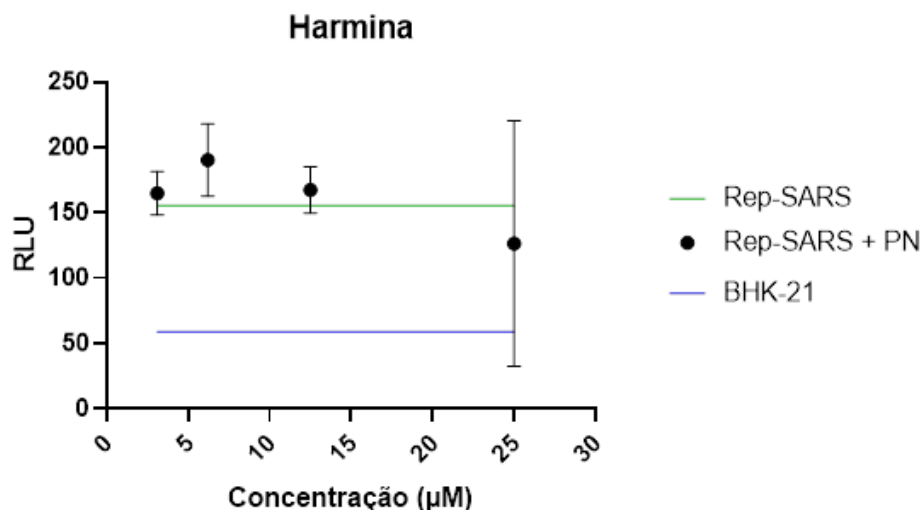
Tan e colaboradores (2022) revisando a vasta literatura que descreve a inibição de vírus de RNA por alcaloides encontrados em plantas da família Amaryllidaceae sugeriram que futuros medicamentos de amplo espectro anticoronavírus, incluindo o SARS-CoV-2, podem ser derivados dessa família. Todavia, a atividade anti-SARS-CoV-2 de extratos de plantas do gênero *Hippeastrum* ainda não foi demonstrada.

Em um estudo sobre a doença de Alzheimer, foi descrito que extratos de *Hippeastrum puniceaum* demonstraram efeitos neuroprotetores que podem estar associados a alcaloides do tipo licorina (Cortes et al., 2015).

5.4.6 Harmina

A harmina não reduziu a atividade de luciferase do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo nas concentrações de 12,5 a 3,1 μM (figura 10).

Figura 10. Efeito dose-resposta da harmina na expressão da luciferase do replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo



. Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 25, 12,5; 6,2 e 3,1 μM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

A harmina é isolada das sementes da planta medicinal *Peganum harmala* que cresce em áreas áridas, como o Oriente Médio e algumas províncias da China, amplamente utilizada na medicina popular há muito tempo (Miller et al., 2019).

Este alcaloide também apresenta diversas atividades farmacológicas, incluindo atividade anti-inflamatória, neuroprotetora, antidiabética e antitumoral. Além disso, a harmina exibe efeitos inseticidas antibacteriano e antivirais. A harmina apresentou ação antiviral contra citomegalovírus humano, herpes vírus simples tipo 2 (Chen et al, 2015; Zhang et al., 2020).

A atividade neuroprotetora da harmina, por ser devido à sua atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChEIs) (Zheng et al., 2009). Sabendo-se que o agravamento da COVID-19 pode ser causado por tempestades de citocinas e hiperinflamação, e que tais eventos podem estar associados aos altos níveis de ACh e mediadores lipídicos, a harmina pode ser considerada uma substância promissora a ser

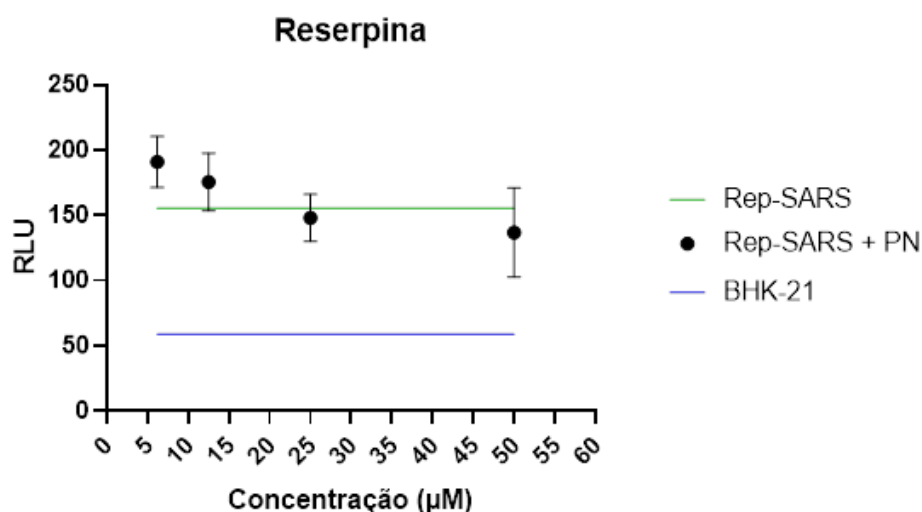
investigada para o uso no tratamento da COVID-19 (Huang et al., 2020; Pérez et al., 2021).

Entretanto a atividade anti-SARS-COV-2 da harmina ainda não foi demonstrada.

5.4.7 Reserpina

O tratamento com reserpina de células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não inibiu a expressão da luciferase GLuc em nenhuma das concentrações testadas (Figura 11).

Figura 11. Efeito dose-resposta da reserpina na expressão da luciferase do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 50, 25, 12,5 e 6,2 µM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

A reserpina, um alcaloide encontrado em algumas espécies de plantas do gênero de *Rauwolfia spp.* (Apocynaceae), é um medicamento antipsicótico e anti-hipertensivo (Wachtel et al., 2011).

Chen e colaboradores (2021) relataram que a reserpina mostrou atividade contra SARS-CoV-2, com IC₅₀ = 11,2 µM em células Vero E6. Além disso, Jin e

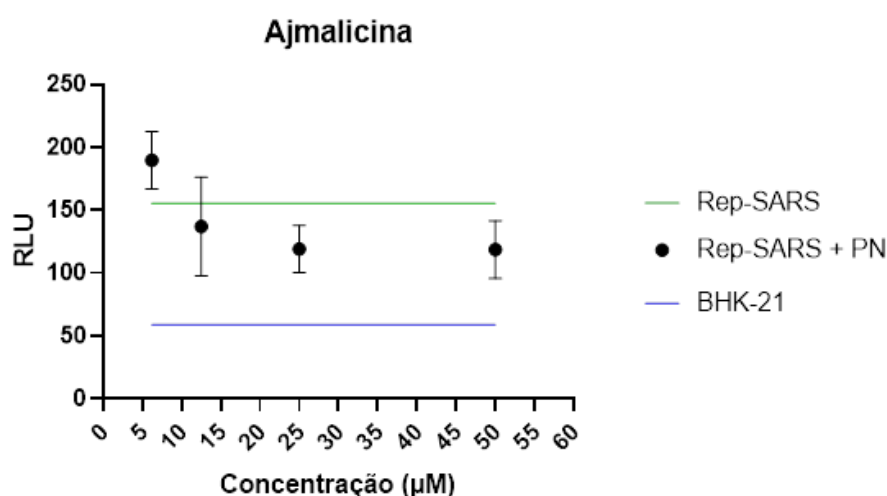
colaboradores (2021) sugeriram que a combinação reserpina e remdesivir tem potencial sinérgico contra SARS-CoV-2. Porém, tal combinação ainda não testada.

A replicação do SARS-CoV foi inibida pela reserpina, com IS de 7,3 em Vero E6. A atividade anti-SARS-CoV pode ser por meio da inibição a atividade da enzima 3CLpro, responsável pela regulação da atividade do complexo de replicação do coronavírus (Wu et al., 2004).

5.4.8 Ajmalicina

O efeito da ajmalicina na atividade da luciferase não foi conclusivo, mas pode-se notar uma tendência na diminuição da atividade da luciferase. Dessa forma, outros experimentos devem ser realizados para verificarmos o efeito da ajmalicina na expressão da GLuc do sistema replicon BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo (figura 12).

Figura 12. Efeito dose-resposta da ajmalicina na expressão da luciferase do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 50, 25, 12,5 e 6,2 µM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

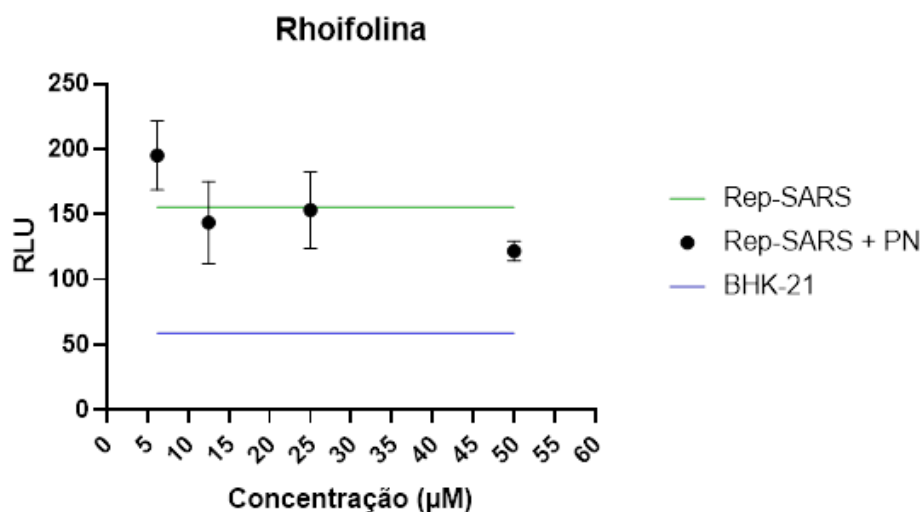
Um estudo da doença de Alzheimer que buscou ligantes direcionado a múltiplos alvos da ajmalicina, demonstrou potencial neuroprotetor in vitro contra a toxicidade de amiloide β e contra estresse oxidante em células PC12. Contudo, a ajmalicina demonstrou ser um ligante direcionado a múltiplos alvos (Kashyap et al., 2020).

Todavia sua ação contra o SARS-CoV-2 e contra outros vírus ainda não foi demonstrada.

5.4.9 Rhoifolina

Não foi verificada inibição significativa da atividade da luciferase pelo tratamento com a rhoifolina de células BHK-rep-SARS-CoV-2, como mostrado na figura 13.

Figura 13. Efeito dose-resposta da rhoifolina na atividade da luciferase do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 50, 25, 12,5 e 6,2 µM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela Gluc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

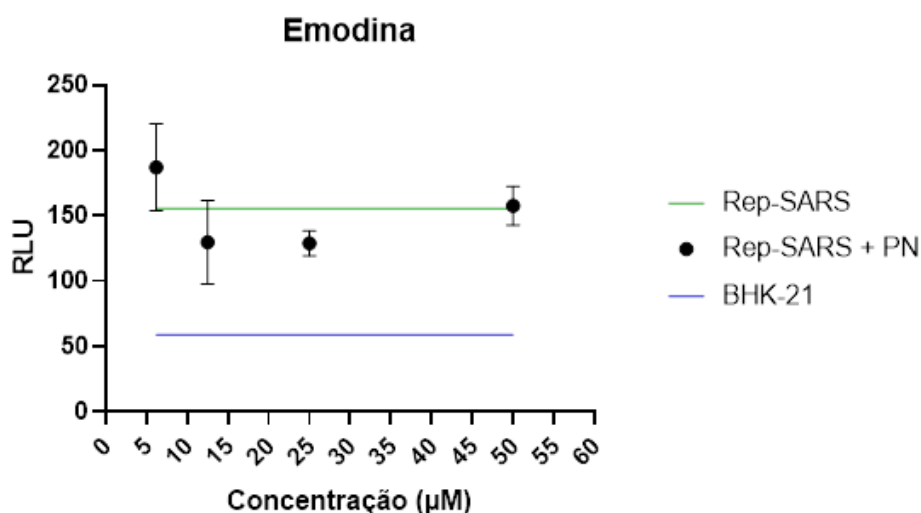
A atividade antileishmania e antipiréticas da rhoifolina, isolada de *Zanthoxylum rhoifolium*, já foi demonstrada. A planta de origem da rhoifolina é tradicionalmente usada no tratamento e prevenção da malária, de inflamação, infecção microbiana e câncer (Leite et al., 2009; Loizzo et al., 2018).

Esse flavonoide foi considerado promissor para tratamento de COVID-19 (Tegen et al., 2021; Adhikari et al., 2021), entretanto sua atividade contra SARS-CoV-2 não foi demonstrada.

5.4.10 Emodina

Nenhuma das concentrações de emodina utilizadas no tratamento de células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo foi capaz de inibir a atividade da luciferase do sistema replicon repórter, como mostrado na figura 14.

Figura 14. Efeito dose-resposta da emodina na atividade da luciferase do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 50, 25, 12,5 e 6,2 µM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4 A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

A emodina é uma antraquinona, produzida por plantas comumente usadas na medicina chinesa tradicional como *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum multiflorum* e por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Pyrenochaeta*, *Pestalotiopsis* por causa das suas propriedades laxativa, antibacteriana e anti-inflamatórias (Dong et al., 2016; Monisha et al., 2016).

A atividade anti SARS-CoV de extratos de 312 ervas medicinais chinesas controladas e supervisionadas pelo Comitê de Medicina e Farmácia Chinesa em Taiwan, foi investigada utilizando um retrovírus expressando a proteína S, em células Vero E6. Três extratos de ervas da família Polygonaceae inibiram de forma dose dependente a interação da proteína S do SARS-CoV com a proteína ACE2, inibindo a entrada deste coronavírus (Ho et al., 2007; Schwarz et al., 2011).

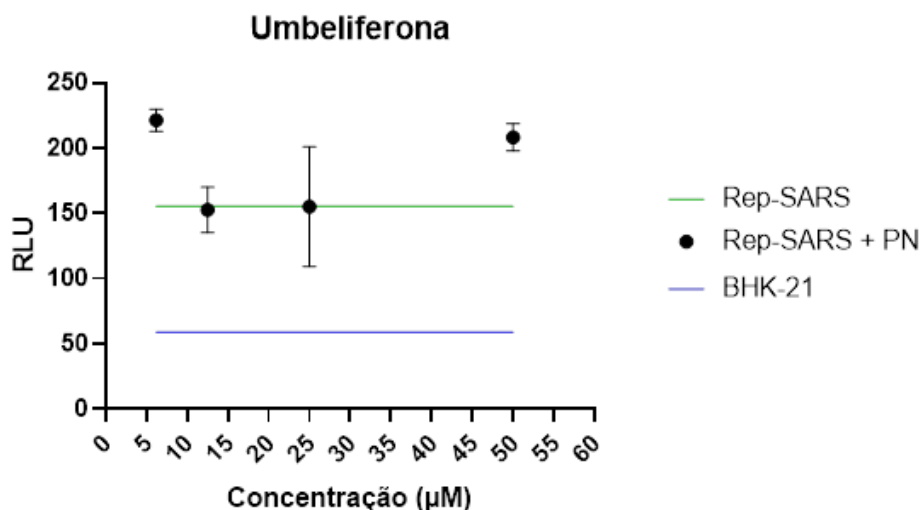
A potencial atividade antiviral da emodina contra o SARS-CoV-2 foi sugerida, mas não ainda não foi demonstrada. (Zhou et al., 2020; Jang et al., 2021; Shao et al., 2022),

5.4.11 Umbeliferona

O tratamento por 72 horas com umbeliferona não inibiu o sinal da luciferase em células BHK-rep-SARS-CoV-2 em nenhuma das concentrações testadas, como mostrado na figura 15.

A umbelliferona, ou 7-hidroxicumarina, uma cumarina, produzida por diversas plantas, além de sua atividade antibiótica, antimicrobiana e antifúngica, possui propriedades antiartríticas, antitumorais, e atividade de proteção do pâncreas e do sistema nervoso (Kumar et al., 2013). Swetha e colaboradores (2019) demonstraram que a umbeliferona, pode causar aumento do estresse oxidativo e posterior apoptose bacteriana além de reduzir a expressão de genes que codificam fatores envolvidos na formação do biofilme bacteriano.

Figura 15. Efeito dose-resposta da umbeliferona na expressão da luciferase do sistema replicon repórter.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 50, 25, 12,5 e 6,2 µM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela Gluc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

Jia e colaboradores (2019), demonstraram que as cumarinas possuem atividade antifúngica contra *Candida albicans* com atividade relacionada a apoptose,

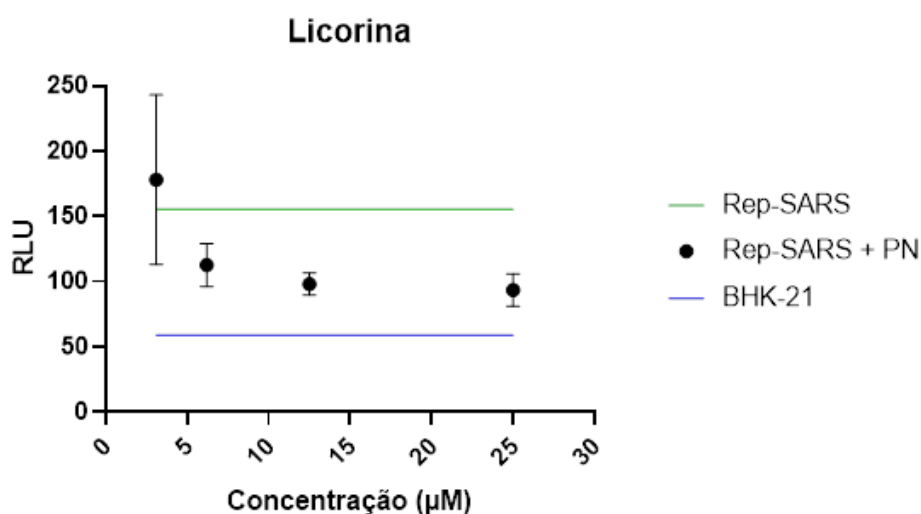
resultante da migração de fosfatil serina para o exterior da membrana plasmática, da fragmentação do DNA, e da condensação nuclear.

5.4.12 Licorina

Como mencionado anteriormente a atividade antiviral da licorina, um alcaloide abundante em amarilidáceas, já foi descrita contra vários vírus, incluindo o SARS-CoV-2.

Nas concentrações de 25 μM , 12,5 μM e 6,2 μM , a licorina inibiu de forma significativa a expressão da luciferase do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo (figura 16). Os valores de p estão listados anexo 1 do Apêndice.

Figura 16. Efeito dose-resposta da licorina no sinal da luciferase do replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2 GlucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 25, 12,5, 6,2 e 3,1 μM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela Guc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

De fato, a ação inibidora da licorina sobre a expressão da GLuc do sistema repórter era esperada, uma vez que este PN foi capaz de inibir a multiplicação do SARS-CoV-2 como descrito por Zhang e colaboradores (2020). Estes autores mostraram que a licorina inibiu a multiplicação de SARS-CoV-2 infeccioso de forma dose-dependente em células Vero-E6 e em células tumorais imortais Huh-7, derivadas

de tumor hepático humano, comprovada pela inibição do efeito citopático e imunofluorescência indireta. Em células Vero-E6 a licorina apresentou IS=129 contra o SARS-CoV-2, com CE₅₀ de 0,31 µM e CC₅₀ acima de 40 µM (Zhang et al., 2020).

Barsbosa (2019) em sua tese de doutorado verificou que a licorina e outros produtos naturais produzidos pelas amarilidáceas *Hippeastrum puniceum* e *H. glaucescens*, como a pretazetina, a narciclasina e a narciclasina-4-O-β-D-xilopiranosídeo, demonstraram atividade antiviral não virucida, com IS de 8,4 e 3,7 contra DENV-2 e ZIKV, respectivamente. De forma contrária, os derivados mono e diacetilados de licorina, apesar de menos citotóxicos, foram inativos contra DENV-2 e ZIKV. Nenhuma potenciação da atividade anti-ZIKV e anti-DENV-2 foi observada quando a licorina e de pretazetina foram combinadas em diversas concentrações (Barbosa, 2019).

A licorina é também conhecida por sua ação anticancerígena e antibacteriana. Vários estudos mostraram que a licorina e seus derivados possuem uma variedade de efeitos farmacológicos, desempenhando um papel importante na regulação da autofagia e apoptose, inibição da atividade da acetilcolinesterase, além dos seus efeitos anti-inflamatórios, antifúngicos, antivirais, antimaláricos, antitumorais. (Xiao et al., 2022; Pal et al., 2023).

O mecanismo exato da ação antiviral da licorina não é conhecido. Zhang e colaboradores (2020) sugeriram que atividade anti-SARS-CoV-2 da licorina é provavelmente atribuída à modulação de fatores do hospedeiro, em vez de afetar diretamente os fatores virais.

5.4.13 Galato de epigalocatequina

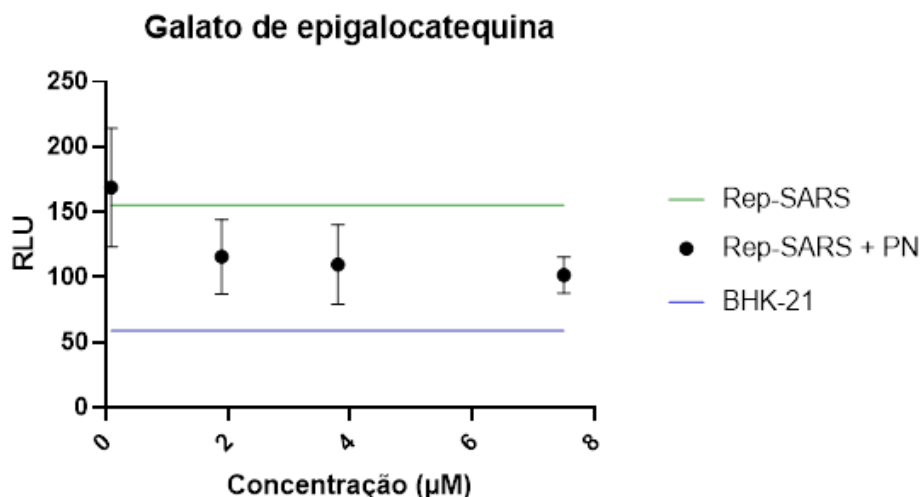
O efeito do galato de epigalocatequina na atividade da luciferase do replicon repórter foi inconclusivo por causa do desvio padrão dos valores de RLU obtidos como mostrado na Figura 17.

Visto que a CMNC do galato de epigalocatequina foi 6,3 µM, a diminuição do sinal da luciferase em células tratadas com 8 µM foi devido ao seu efeito citotóxico sobre o sistema replicon (Tabela 6).

O galato de epigalocatequina, principal componente das catequinas do chá verde proveniente da *Camelia sinensis*, é conhecido por possuir atividades antivirais contra uma ampla gama de vírus de DNA e vírus de RNA de polaridade positiva ou

negativa, além de apresentar propriedades antimicrobianas e anticancerígenas (Kaihatsu et al., 2018).

Figura 17. Efeito dose-resposta do galato de epigalocatequina na expressão da luciferase do sistema de replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2-GLucNeo.



Monocamadas de células BHK-rep-SARS-CoV-2 foram tratadas, em triplicata, com as doses de 7,5; 3,8; 1,9; 0,09 µM do PN foram submetidas ao ensaio da luciferase, como descrito no item 4.4. A linha verde representa a média dos valores, medidos em unidade relativa de luz (RLU), do sinal de luminescência produzido pela GLuc nas células BHK-rep-SARS-CoV-2 GLucNeo não tratadas, adicionadas de DMSO a 0,5%. A linha azul representa a média dos valores de RLU verificados nas células BHK-21 sem replicon, utilizadas como controle negativo de luminescência. Fonte: O autor.

O galato de epigalocatequina inibe principalmente os estágios iniciais da infecção viral interferindo em proteínas virais de membrana, proteínas celulares ou ambas (Kaihatsu et al., 2018).

A avaliação *in silico* de possíveis flavonoides com atividade inibidora de proteases do SARS-CoV-2, sugeriu que o galato de epigalocatequina como um dos compostos promissores (Peterson, 2020). Contudo, a atividade antiviral *in vitro* ou *in vivo* deste PN contra SARS-CoV-2 e outros vírus ainda não foi demonstrada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O desempenho do sistema replicon repórter BHK-rep-SARS-CoV-2-Gluc-Neo verificado neste trabalho foi considerado aquém do esperado, quando comparado ao verificado em outros laboratórios usuários deste sistema. Para comparação dos resultados aqui obtidos, a atividade dos extratos/PN utilizados neste estudo será avaliado em outros laboratórios usuários deste sistema replicon repórter que utilizam luminômetros com injetores de reagentes para a leitura do ensaio da luciferase.

Os valores modestos de RLU referentes à expressão constitutiva da GLuc luciferase no sistema repórter BHK-rep-SARS-CoV-2-Gluc-Neo indicaram que há necessidade de adequação de procedimentos e equipamentos para leitura do ensaio da luciferase para que este sistema replicon repórter seja utilizado a contento como ferramenta para triagem da atividade antiviral de coleção de extratos/compostos na Fiocruz Minas. Além disso, este sistema de poderá ser útil para a triagem de frações de extratos brutos de plantas e de fungos com ação anti-SARS-CoV-2 obtidas por fracionamento por cromatografia de ultra alta performance acoplada a espectrometria de massas.

7 REFERÊNCIAS

ABUO-RAHMA G. E. A *et al.* S Potential repurposed SARS-CoV-2 (COVID-19) infection drugs. **RSC Adv.**, v. 10, n. 45, p. 26895-26916, 2020. doi: 10.1039/d0ra05821a.

ADHIKARI, B. *et al.* Potential roles of medicinal plants for the treatment of viral diseases focusing on COVID-19: A review. **Phytother Res.**, v. 35, n. 3, p. 1298-1312, 2021. doi: 10.1002/ptr.6893.

ANVISA, 2023. Medicamentos aprovados para tratamento da Covid-19. **JAMA.** 2020. **JAMA.** 2020. doi:10.1001/jama.2020.2565 Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>son of COVID-19. Acesso em: 19 de fevereiro de 2023.

ANVISA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/secom/pt-br/fatos/brasil-contra-fake/noticias/2023/3/anvisa-comprova-seguranca-e-eficacia-da-vacina-bivalente>. Acesso em: 01 de junho de 2023.

ATANASOV, AG; ZOTCHEV, SB; DIRSCH VM; International Natural Product Sciences Taskforce; Supuran CT. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z.

BADEN, LR *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **N Engl J Med.**, v. 384, n. 5, p. 403-416, p. 2021. doi.org/10.1056/NEJMoa2035389

BARBOSA, Emerson de Castro. Avaliação da Atividade Antiviral de Extratos Vegetais e de Fungos contra Dengue Virus. 2015. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Centro de Pesquisas René Rachou, **Fundação Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, 2015.

BARBOSA, Emerson de Castro. Avaliação da atividade antiviral de extratos brutos e substâncias, obtidos de plantas e de fungos, contra os vírus Dengue, Zika e Chikungunya. 2019. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde - Área de concentração: Área de concentração: Biologia Celular e Molecular)-Instituto René Rachou, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, **Fundação Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, 2019.

BERGMANN, CC; SILVERMAN, RH. COVID-19: Coronavirus replication, pathogenesis, and therapeutic strategies. **Cleve Clin J Med.**, v. 87, n. 6, p. 321-327, 2020. doi: 10.3949/ccjm.87a.20047.

CDC, 2023; Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/treatments-for-severe-illness.html>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2023.

CHAU, NVV *et al.* The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. **Clin Infect Dis.**, v. 71, n. 10, p. 2679-2687. doi: 10.1093/cid/ciaa711.

CHEN, CZ *et al.* Drug Repurposing Screen for Compounds Inhibiting the Cytopathic Effect of SARS-CoV-2. **Front Pharmacol.**, v. 11, 592737, 2021. doi: 10.3389/fphar.2020.592737.

CHEN, D *et al.* Harmine blocks herpes simplex virus infection through downregulating cellular NF- κ B and MAPK pathways induced by oxidative stress. **Antiviral Res.**, v. 123, p. 27-38, 2015. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.09.003.

CHU, DK *et al.* Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Lancet.**, v. 395, n. 10242, p. 1973-1987, 2020. doi:10.1016/S0140-6736(20)31142-9.

CORTES, N *et al.* Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: a comparative study. **Life Sci.**, v. 122, p. 42-50, 2015. doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.011.

DE CASTRO BARBOSA E *et al.* Searching for plant-derived antivirals against dengue virus and Zika virus. **Virologia J.**, v. 19, n. 1, 31, 2022. doi: 10.1186/s12985-022-01751-z.

DE QUEIROZ, JCE; LEITE, JRSA; VASCONCELOS AG. Prospecting Plant Extracts and Bioactive Molecules with Antimicrobial Activity in Brazilian Biomes: A Review. **Antibiotics**, v. 12, n. 3, 427, 2023. doi: 10.3390/antibiotics12030427.

DONG X, FU J, YIN X *et al.* Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. **Phytother Res.** 2016 ;30(8):1207-18. doi: 10.1002/ptr.5631.

ECDC, 2022. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/sars-cov-2-and-influenza-antiviral-resistance-monitoring-capability.pdf>. Acesso em: 03 de Janeiro de 2023.

CHENG, FJ *et al.* Umbelliferone and eriodictyol suppress the cellular entry of SARS-CoV-2. **Cell Biosci.**, v. 13, n. 1, 118, 2023. doi: 10.1186/s13578-023-01070-y.

FRANCIS, AI *et al.* Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. **Postgrad Med J.**, v. 98, n. 1159, 389-394, 2022. doi: 10.1136/postgradmedj-2021-140654.

FREIRE, M.C.L.C. *et al.* Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from Chikungunya virus and discovery of a novel ligand as a potential drug candidate. **Sci Rep** 12, v. 12, n. 1, 10601, 2022. doi: 10.1038/s41598-022-14790-x.

FRICKE-GALINDO, I; FALFÁN-VALENCIA, R. Pharmacogenetics Approach for the Improvement of COVID-19 Treatment. **Viruses**, v. 13, n. 3. 413, 2021. doi: 10.3390/v13030413.

GAO, Q *et al.* Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. **Science**, v. 369. N. 6499, p. 77-81, 2020. doi: 10.1126/science.abc1932.

GERLIER, D; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J Immunol Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, 1986. doi: 10.1016/0022-1759(86)90215-2.

GORDON, C; PORTEOUS, D; UNSWORTH, J. COVID-19 vaccines and vaccine administration. **Br J Nurs.**, v. 30, n. 6, p. 344-349, 2021. doi: 10.12968/bjon.2021.30.6.344.

HADJ, HASSINE I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. **Rev Med Virol.**, v. 32, n. 4, e2313, 2022. doi: 10.1002/rmv.2313.

HE, X *et al.* Generation of SARS-CoV-2 reporter replicon for high-throughput antiviral screening and testing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 118, n. 15, e2025866118, 2021. doi: 10.1073/pnas.2025866118.

HEITMAN, LH *et al.* False positives in a reporter gene assay: identification and synthesis of substituted N-pyridin-2-ylbenzamides as competitive inhibitors of firefly luciferase. **J Med Chem.**, v. 51, n. 15, p. 4724-4729, 2008. doi: 10.1021/jm8004509.

HERRERO, URIBE L; CHAVES, OLARTE E; TAMAYO CASTILLO, G. In vitro antiviral activity of *Chamaecrista nictitans* (Fabaceae) against herpes simplex virus: biological characterization of mechanisms of action. **Rev Biol Trop.**, v. 52, n. 3, p. 807-816, 2004.

HIDALGO, P; VALDÉS, M; GONZÁLEZ, RA. Molecular biology of coronaviruses: an overview of virus-host interactions and pathogenesis. **Bol Med Hosp Infant Mex.**, v.78, n. 1, p. 41-58, 2021. doi: 10.24875/BMHIM.20000249.

HO, TY *et al.* Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. **Antiviral Res.**, v. 74, n. 2, p. 92-101, 2007. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.04.014.

HUANG, C *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

ISON, MG *et al.* Influenza polymerase inhibitor resistance: Assessment of the current state of the art - A report of the isirv Antiviral group. **Antiviral Res.**, v. 194, 105158, 2021. doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105158.

JANG, WD *et al.* Drugs repurposed for COVID-19 by virtual screening of 6,218 drugs and cell-based assay. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 118, n. 30, e2024302118, 2021. doi: 10.1073/pnas.2024302118.

JIA, C *et al.* Antifungal Activity of Coumarin Against *Candida albicans* Is Related to Apoptosis. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 8, 445, 2019. doi: 10.3389/fcimb.2018.00445.

JIN, W *et al.* Deep learning identifies synergistic drug combinations for treating COVID-19. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 118, n. 39, e2105070118, 2021. doi: 10.1073/pnas.2105070118.

JOCHMANS, D *et al.* The Substitutions L50F, E166A, and L167F in SARS-CoV-2 3CLpro Are Selected by a Protease Inhibitor In Vitro and Confer Resistance to Nirmatrelvir. **mBio**, v. 14, n. 1, e0281522, 2023; doi: 10.1128/mbio.02815-22.

KAIHATSU, K; YAMABE, M; EBARA, Y. Antiviral Mechanism of Action of Epigallocatechin-3-O-gallate and Its Fatty Acid Esters. **Molecules**, v. 23, n. 10, 24752018. doi: 10.3390/molecules23102475.

KASHYAP, P *et al.* Ajmalicine and Reserpine: Indole Alkaloids as Multi-Target Directed Ligands Towards Factors Implicated in Alzheimer's Disease. **Molecules**, v. 25, n. 7, 16092020. doi: 10.3390/molecules25071609.

KLOMPAS, M; BAKER, MA; RHEE, C. Airborne Transmission of SARS-CoV-2: Theoretical Considerations and Available Evidence. **JAMA**, v. 324, n. 5, p. 441-442. 2020. doi: 10.1001/jama.2020.12458.

KRISHNAN, DA *et al.* Structure-based drug designing towards the identification of potential anti-viral for COVID-19 by targeting endoribonuclease NSP15. **Inform Med Unlocked** v. 20, 100392, 2020. doi: 10.1016/j.imu.2020.100392.

Kumar, S *et al.* Identification of phytochemicals as potential therapeutic agents that binds to Nsp15 protein target of coronavirus (SARS-CoV-2) that are capable of inhibiting virus replication. **Phytomedicine**, v. 85, p. 153317, 2020. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153317.

KUMAR, V *et al.* Enhanced glycemic control, pancreas protective, antioxidant and hepatoprotective effects by umbelliferon- α -D-glucopyranosyl-(2(I) \rightarrow 1(II))- α -D-glucopyranoside in streptozotocin induced diabetic rats. **Springerplus**, v. 2, 639, 2013. doi: 10.1186/2193-1801-2-639.

KUO, CJ *et al.* Kinetic Characterization and Inhibitor Screening for the Proteases Leading to Identification of Drugs against SARS-CoV-2. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 65, n. 4, e02577-20, 2021. doi: 10.1128/AAC.02577-20.

LEITE, A. C. *et al.* Screening of Trypanosoma cruzi glycosomal lyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase enzyme inhibitors. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, 1–6, 2009.

LIN, DY *et al.* Effectiveness of Bivalent Boosters against Severe Omicron Infection. **N Engl J Med.**, v. 388, n. 8, p. 764-766, 2023. doi: 10.1056/NEJMc2215471.

LOGUNOV, DY *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. **Lancet**, v. 397, n. 10275, p. 671-681, 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8.

LOIZZO, MR *et al.* RUTA CHALEPENSIS L. (Rutaceae) leaf extract: chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities. **Nat Prod Res.**, v. 32, n. 5, 521-528, 2018. doi: 10.1080/14786419.2017.1326491.

LONG, B *et al.* Cardiovascular complications in COVID-19. **Am J Emerg Med.**, v. 38, n. 7, p. 1504-1507, 2020. doi: 10.1016/j.ajem.2020.04.048.

LOPES, SM *et al.* Natural Products Against COVID-19 Inflammation: A Mini-Review. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 25, n. 14, p. 2358-2369, 2022. doi: 10.2174/1386207325666220128114547.

LÜCKE, AC *et al.* High-Throughput Platform for Detection of Neutralizing Antibodies Using Flavivirus Reporter Replicon Particles. **Viruses**, v. 14, n. 2, 346, 2022. doi: 10.3390/v14020346.

LUO, L *et al.* Contact Settings and Risk for Transmission in 3410 Close Contacts of Patients With COVID-19 in Guangzhou, China: A Prospective Cohort Study. **Ann Intern Med.**, v. 173, n. 11, p. 879-887, 2020. doi: 10.7326/M20-2671.

LUXENBERG, J.; FEIGENBAUM, L.Z. The use of reserpine for elderly hypertensive patients. **J.Am. Geriatr. Soc.** v. 31, p. 556–559, 1983.

MAGUIRE, CA *et al.* Gaussia luciferase variant for high-throughput functional screening applications. **Anal Chem.**, v. 81, n. 16, 7102-7106, 2009. doi: 10.1021/ac901234r.

MATEOS-MARTÍN, ML *et al.* Identification of polyphenols from antiviral Chamaecrista nictitans extract using high-resolution LC-ESI-MS/MS. **Anal Bioanal Chem.**, v. 406, n. 22, p. 5501-5506, 2014. doi: 10.1007/s00216-014-7982-6.

MCALOON, C *et al.* Incubation period of COVID-19: a rapid systematic review and meta-analysis of observational research. **BMJ Open**, v. 10, n. 8, e0396522020. doi: 10.1136/bmjopen-2020-039652.

MENÉNDEZ-ARIAS, L; DELGADO, R. Update and latest advances in antiretroviral therapy. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 43, n. 1, p. 16-29, 2022. doi: 10.1016/j.tips.2021.10.004.

MERAD, M *et al.* The immunology and immunopathology of COVID-19. **Science**, v. 375, n. 6585, p. 1122-1127, 2022. doi: 10.1126/science.abm8108.

MERCADO, NB *et al.* Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. **Nature**, v. 586, n. 7830, p. 583-588, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2607-z.

MILLER, MJ *et al.* Chemical evidence for the use of multiple psychotropic plants in a 1,000-year-old ritual bundle from South America. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 116, p. 11207–11212, 2019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902174116>

MONISHA, BA; KUMAR, N; TIKU, AB. Emodin and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol*, v. 928, p. 47-73, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-41334-1.

NEWMAN, DJ; CRAGG, GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NIRMA, C *et al.* New *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase inhibitors from Brazilian flora. *RSC Adv.*, v. 9, n. 32, p. 18663-18669, 2019. doi: 10.1039/c9ra02382h.

NUNES, BC *et al.* Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. *Industrial Crops and Products*, v. 92, p. 277-289, 2016. 10.1016/j.indcrop.2016.08.016.

OPAS, 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19#:~:text=Em%2011%20de%20mar%C3%A7o%20de,e%20n%C3%A3o%20%C3%A0%20sua%20gravidade>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2023.

PAL. T *et al.* Harnessing and bioprospecting botanical-based herbal medicines against potential drug targets for COVID-19: a review coupled molecular docking studies. *J Biomol Struct Dyn.*, v. 27, p. 1-23, 2023. doi: 10.1080/07391102.2023.2187634.

PALACIOS, R *et al.* Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of treating Healthcare Professionals with the Adsorbed COVID-19 (Inactivated) Vaccine Manufactured by Sinovac – PROFISCOV: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **21**, v. 853, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04775-4>

PANG, X; ZHANG, M; DAYTON, AI. Development of Dengue virus type 2 replicons capable of prolonged expression in host cells. *BMC Microbiol.*, v. 1, 18, 2001. doi: 10.1186/1471-2180-1-18.

PETERSON, LEIF. COVID-19 and Flavonoids: In Silico Molecular Dynamics Docking to the Active Catalytic Site of SARS-CoV and SARS-CoV-2 Main Protease (May 12, 2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3599426> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3599426>.

POLACK, FP *et al.* Clinical Trial Group. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.*, v. 383, n. 27, p. 2603-2615, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2034577.

PUELLES, VG *et al.* Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.*, v. 383, n. 6, p. 590-592, 2020. doi: 10.1056/NEJMc2011400.

QUINTERO, A *et al.* Inhibition of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV-1) replication by *Warscewiczia coccinea* (Vahl) Kl. (Rubiaceae) ethanol extract. *Nat Prod Res.*, v. 25, n. 16, p. 1565-1569, 2011. doi: 10.1080/14786419.2010.535164.

RAUF, A *et al.* In vivo antinociceptive and anti-inflammatory activities of umbelliferone isolated from *Potentilla evestita*. **Nat Prod Res.**, v. 28, n. 17, p. 1371-1374, 2014. doi: 10.1080/14786419.2014.901317.

RAWSON, TM *et al.* Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. **Nat Rev Microbiol.**, v. 18, n. 8, p. 409-410, 2020. doi: 10.1038/s41579-020-0395-y.

ROBERTS, M.F. Alkaloids: Biochemistry, ecology, and medicinal applications; **Springer Science & Business Media**: New York, NY, USA, 2013.

SANDERS, JM *et al.* Pharmacologic Treatments for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 323, n. 18, p. 1824-1836, 2020. doi: 10.1001/jama.2020.6019.

SASAKI-TANAKA, R *et al.* Favipiravir Inhibits Hepatitis A Virus Infection in Human Hepatocytes. **Int J Mol Sci.**, v. 23, n. 5, 2631, 2022. doi: 10.3390/ijms23052631.

SCHWARZ, S *et al.* Emodin inhibits current through SARS-associated coronavirus 3a protein. **Antiviral Res.**, v. 90, n. 1, p. 64-69, 2022. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.02.008.

SHARMA, D *et al.* Bioactivity and In Silico Studies of Isoquinoline and Related Alkaloids as Promising Antiviral Agents: An Insight. **Biomolecules**, v. 13, n. 1, 17, 2022. doi: 10.3390/biom13010017.

SHAO, Q *et al.* Promising Role of Emodin as Therapeutics to Against Viral Infections. **Front Pharmacol.**, v. 13, 902626, 2022. doi: 10.3389/fphar.2022.902626.

SHEREEN, MA *et al.* COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **J Adv Res.**, v. 24, p. 91-98, 2021. doi: 10.1016/j.jare.2020.03.005.

SOBREIRA, Marcene Lima *et al.* Vacinas para covid-19 e complicações tromboembólicas. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 20, e20210167, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1677-5449.210167>>. Acesso em: 26 abril 2023.

SOUZA, Eliza Flores. Busca da atividade antiviral de extratos vegetais e fúngicos, produtos naturais e sintéticos contra o vírus selvagem da febre amarela; Dissertação de mestrado. **Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Minas**, 2023.

SWETHA, TK *et al.* Umbelliferone Impedes Biofilm Formation and Virulence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* via Impairment of Initial Attachment and Intercellular Adhesion. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 9, p. 357, 2019. doi: 10.3389/fcimb.2019.00357.

TAKATSU, K *et al.* Biophysical analysis of *Gaussia luciferase* bioluminescence mechanisms using a non-oxidizable coelenterazine. **BBA Adv.**, v. 3, 100068, 2021. doi: 10.1016/j.bbadv.2022.100068.

TEGEN, D; DESSIE, K; DAMTIE D. Candidate Anti-COVID-19 Medicinal Plants from Ethiopia: A Review of Plants Traditionally Used to Treat Viral Diseases. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2021, 6622410, 2021. doi: 10.1155/2021/6622410.

THORLUND, K *et al.* A real-time dashboard of clinical trials for COVID-19. **Lancet Digit Health**, v. 2, n. 6, e286-e287, 2020. doi: 10.1016/S2589-7500(20)30086-8.

VASIREDDY, D *et al.* Review of COVID-19 Variants and COVID-19 Vaccine Efficacy: What the Clinician Should Know? **J Clin Med Res.**, v. 13, n. 6, p. 317-325, 2021. doi: 10.14740/jocmr4518. Erratum in: **J Clin Med Res.**, v. 13, n. 7, 412, 2021.

VOYSEY, M *et al.* Oxford COVID Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. **Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 99-111, 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32661-1. Erratum in: **Lancet**, v; 397, n. 10269, 98, 2021.

XIE, X *et al.* Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, v. 12, p. 156-160, 2016. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.013.

WIDDER, EA. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 704-708, 2010. doi: 10.1126/science.1174269.

WIERSINGA, WJ *et al.* Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. **JAMA**, v. 324, n. 8, p. 782-793, 2020. doi: 10.1001/jama.2020.12839. PMID: 32648899.

WHO, 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 20/02/2023.

WU, CY *et al.* Small molecules targeting severe acute respiratory syndrome human coronavirus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 27, p. 10012-10017, 2004. doi: 10.1073/pnas.0403596101

WU, F *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3. Erratum in: **Nature**, v.580, n. 7803, E7, 2020.

XIAO, H *et al.* Lycorine and organ protection: Review of its potential effects and molecular mechanisms. **Phytomedicine**, v. 104, 154266, 2022. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154266.

XIE, X *et al.* Zika Virus Replicons for Drug Discovery. **EBioMedicine**, v. 12, p. 156-160, 2016. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.013.

ZHANG, QY *et al.* SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening. **J Gen Virol.**, v. 102, n. 5, 001583, 2021. doi: 10.1099/jgv.0.001583.

ZHOU, Y *et al.* Network-based drug repurposing for novel coronavirus 2019-nCoV/SARS-CoV-2. **Cell Discov.**, v. 6, 14, 2020. doi: 10.1038/s41421-020-0153-3.

ZHU, N *et al.* China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med.**, v. 382, n. 8, 727-733, 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2001017.

8. APÊNDICE

TABELA A1- VALORES DE P VERIFICADOS NO ENSAIO DE LUCIFERASE PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE RESPOSTA DOS EXTRATOS VEGETAIS EM CÉLULAS BHK-rep-SARS-CoV-2

Extrato Vegetal - parte	Concentração µg/mL	Valor de P
EX11279 - <i>Chamaecrista</i> sp. Fruto	Todas	0,5
	3,1	0,66
	6,2	0,03
	12,5	0,41
	25	0,79
EX11298 - <i>Banisteriopsis laevifolia</i> - caule	Todas	0,12
	3,1	0,43
	6,2	0,79
	12,5	0,16
	25	0,16
EX17011 - <i>Hippeastrum puniceum</i> – bulbo	Todas	0,0005
	3,1	0,02
	6,2	0,05
	12,5	0,03
	25	<0,0001
EX19365 - <i>Hippeastrum puniceum</i> – bulbo	Todas	0,002
	3,1	0,82
	6,2	0,95
	12,5	0,01
	25	0,02
EX11129 - <i>Ixora</i> sp – caule	Todas	0,19
	3,1	0,66
	6,2	0,46
	12,5	0,25
	25	0,79
EX11122 - <i>Urvillea</i> sp.- folha	Todas	0,21
	3,1	0,55
	6,2	0,48
	12,5	0,15
	25	0,37

Tabela A2- VALORES DE P VERIFICADOS NO ENSAIO DE LUCIFERASE PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DOSE RESPOSTA DOS PRODUTOS NATURAIS EM CÉLULAS BHK-rep-SARS-CoV-2

Produto Natural	Concentração μM	Valor de P
Harmina	Todas	0,19
	3,1	0,58
	6,2	0,32
	12,5	0,55
	25	0,87
Licorina	Todas	0,06
	3,1	0,84
	6,2	0,05
	12,5	0,02
	25	0,04
Reserpina	Todas	0,01
	6,2	0,14
	12,5	0,35
	25	0,71
	50	0,65
Ajmalicina	Todas	0,05
	6,2	0,16
	12,5	0,71
	25	0,18
	50	0,16
Rhoifolina	Todas	0,02
	6,2	0,18
	12,5	0,85
	25	0,99
	50	0,06
Emodina	Todas	0,72
	6,2	0,39
	12,5	0,44
	25	0,07
	50	0,94
Umbeliferona	Todas	0,71
	6,2	0,02
	12,5	0,97
	25	1,00
	50	0,01
Galato de epigallocatequina	Todas	0,05
	0,09	0,88
	1,9	0,23
	3,8	0,24
	7,5	0,04