

UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA

RITA DE CÁSSIA MARINHO DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI SARS-CoV-2 DOS ALCALOIDES
EXTRAÍDOS DE *Pilocarpus microphyllus* (JABORANDI): UM ESTUDO *IN SILICO***

PARNAÍBA

2022

RITA DE CÁSSIA MARINHO DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI SARS-CoV-2 DOS ALCALOIDES
EXTRAÍDOS DE *Pilocarpus microphyllus* (JABORANDI): UM ESTUDO *IN SILICO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba-
UFDPAr, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador (a): Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira

Co-orientador (a): Prof. Dr. Leiz Maria Costa Vêras

PARNAIBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde
Serviço de Processamento Técnico

A162a Abreu, Rita de Cássia Marinho de.

Avaliação da atividade anti Sars-cov-2 dos Alcaloides extraídos de *Pilocarpus microphyllus* (JABORANDI): Um estudo in silico. [recurso eletrônico] / Rita de Cássia Marinho de Abreu. – 2022.

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira.

1. Jaborandi. 2. Docagem molecular. 3. Alcaloides. I. Título.

CDD: 633.8

RITA DE CÁSSIA MARINHO DE ABREU

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI SARS-CoV-2 DOS ALCALOIDES
EXTRAÍDOS DE *Pilocarpus microphyllus* (JABORANDI): UM ESTUDO *IN SILICO***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal do Delta do Parnaíba-
UFDPAr, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovado em: 03/10/2022

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Jefferson Soares de Oliveira

Membro

Luiz Maria Costa de Sá

Membro

Rodrigo Elísio de Sá

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, à Deus por todas as provações em minha vida.

Aos meus pais Maria da Paixão e Gilmar, que são e sempre serão motivos de força, determinação, paciência e persistência.

Aos meus avós paternos Delmar e Rita Abreu, que me criaram com muita dedicação e amor e aos meus avós maternos, Ercílio e Maria de Jesus, por toda preocupação e carinho.

Aos meu irmãos Luis Eduardo, Gabriel por toda ajuda e amparo quando mais precisei nessa vida de morar sozinha em outra cidade/estado e em especial a Mariana, pelas contribuições no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao meu namorado José Eduardo, por todo apoio e falas de coragem que me fizeram e fazem acreditar mais no que eu sou capaz de realizar.

Ao meu grupo de amigos “falsas” Camilla Raiane, Jessica Lima, Marcelo Augusto, Barbara Ghilardi, Maria Roberta, Maria Helena e Rodrigo Oliveira pelos momentos de descontração e de alegria, é sempre muito bom está com vocês.

As minhas amigas, e companheiras que fiz durante a graduação, Maria Gabrielly, Maria Adrielly, Andressa Trindade e Hinaira Bruna, foi importantíssimo ter vocês ao meu lado para compartilhar de todos os momentos, sejam eles bons ou ruins da vida acadêmica.

A minha Co-orientadora Leiz Vêras, que me abraçou e me deu a oportunidade de conhecer a vasta área da e de fazer pesquisa científica.

Agradeço muito também ao Mestre Paulo Sérgio, que me ajudou nesta etapa final da graduação. Sua ajuda foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

Deixo minha gratidão aos participantes da banca prof. Dr. Jefferson Soares e Me. Rodrigo Elísio, pela disponibilidade e considerações ao estudo.

Gratidão também a todo o corpo docente e de funcionários do curso de Biomedicina, além também da própria Universidade que me proporcionou viver momentos únicos relacionado a pesquisa.

RESUMO

A pandemia ocasionada pelo novo coronavírus (Sars-CoV-2) é considerada como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. O *Pilocarpus microphyllus*, também conhecido popularmente como jaborandi, é uma planta nativa brasileira, em que suas folhas apresentam um amplo espectro de alcaloides que podem ser extraídos. Substâncias como a pilocarpina, epiisopiloturina (EPI) e epiisopilosina (EPIL) são os alcaloides majoritários que constituem esta espécie, possuindo ampla atividade biológica já comprovada. As pesquisas já vem apontando o uso de alcaloides para o tratamento de doenças virais, incluindo a infecção causada pelo Sars-CoV-2. O presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial anti Sars-CoV-2, elucidando parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos antiviral *in silico*, dos alcaloides pilocarpina, epiisopiloturina e epiisopilosina presentes na *P. microphyllus*, além de estudar as interações destes alcaloides com proteínas não estruturais 6YYT (nsp12), 7K7P (nsp1), 2H85 (nsp14) e 7MC5 (nsp15) do SARS-CoV-2, caracterizando assim, como estudo experimental realizado através de docagem molecular. Os três compostos demonstraram características farmacológicas e farmacodinâmicas antivirais favoráveis para serem usados no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A EPIL apresentou melhor valor de energia mínima de ligação com proteína 6YYT (nsp12) igual a $-8.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, porém a pilocarpina e a EPI também demonstraram boas interações com as outras proteínas não estruturais do vírus testadas. Conclui-se que, estes alcaloides possuem energias mínimas de estabilidade e, que ainda, podem inibir o processo de replicação do novo coronavírus, podendo tornar-se ótimos candidatos a antivirais.

Palavras-chaves: Alcaloides; docagem molecular; jaborandi; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The pandemic caused by the new coronavirus (Sars-CoV-2) is considered one of the biggest public health problems in the world. *Pilocarpus microphyllus*, also popularly known as jaborandi, is a native Brazilian plant, whose leaves have a wide spectrum of alkaloids that can be extracted. Substances such as pilocarpine, epiisopiloturine and epiisopilosine are the major alkaloids that constitute this species, having a wide biological activity already proven. Research has already pointed to the use of alkaloids for the treatment of viral diseases, including infection caused by Sars-CoV-2. The present study aimed to evaluate the anti-Sars-CoV-2 potential, elucidating antiviral pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters, in silico of pilocarpine, epiisopiloturine and epiisopilosine alkaloids present in *P. microphyllus*, in addition to studying the interaction of these alkaloids with non-structural proteins 6YYT (nsp12), 7K7P (nsp1), 2H85 (nsp14) and 7MC5 (nsp15) from SARS-CoV-2, thus characterizing it as an experimental study carried out through molecular docking. The three compounds demonstrated favorable antiviral pharmacological and pharmacodynamic characteristics to be used in the development of new therapeutic agents. EPIL showed the best minimum binding energy value with 6YYT protein (nsp12) equal to $-8.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, but pilocarpine and EPI also showed good interactions with the other non-structural proteins of the virus tested. It is concluded that these alkaloids have minimum stability energies and that they can also inhibit the replication process of the new coronavirus, making them great candidates for antivirals.

Keywords: Alkaloid; molecular docking; jaborandi; SARS-CoV-2.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades farmacocinética dos alcaloides	19
Tabela 2- Propriedades da farmacodinâmica antiviral dos alcaloides.....	21
Tabela 3- Parâmetros de afinidade molecular do composto pilocarpina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5.....	23
Tabela 4- Parâmetros de afinidade molecular do composto epiisopilosina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5.....	25
Tabela 5- Parâmetros de afinidade molecular do composto epiisopiloturina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Proteínas não estruturais (nsp) envolvidas no processo de transcrição e replicação do SARS-CoV-2.....	9
Figura 2-Jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth).....	12
Figura 3- Estrutura química da pilocarpina (A); epiisopiloturina (B) e epiisopilosina (C).....	16
Figura 4-Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 6YYT e o ligante pilocarpina ilustrando o sitio de ligação ativo (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B e C).	24
Figura 5-Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 6YYT e o ligante epiisopilosina ilustrando o sitio de ligação ativo (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B).....	26
Figura 6-Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 2H85 e o ligante epiisopiloturina ilustrando o sitio de ligação ativo (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B e C).	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina Humana 2
CoVs	Coronavírus
CYP	Citocromo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPI	Epiisopiloturina
EPIL	Epiisopilosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana 2
mRNA	RNA mensageiro
NSP	Proteína não estrutural
RTC	Complexo replicação-transcrição
RpRd	RNA polimerase dependente de RNA
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
TGI	Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 SARS-CoV-2 E A COVID-19.....	7
2.2 INFLAMAÇÃO PULMONAR	10
2.3 <i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardlew	11
3.OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GERAL.....	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4.METODOLOGIA.....	16
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS LIGANTES	16
4.2 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS.....	16
4.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN SILICO</i>	17
4.4 DOCAGEM MOLECULAR	17
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS.....	19
5.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN SILICO</i>	21
5.3 DOCAGEM MOLECULAR	22
5.3.1 Pilocarpina	22
5.3.2 Epiisopilosina	25
5.3.3 Epiisopiloturina	27
6.CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1.INTRODUÇÃO

A pandemia da COVID-19 gerada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) tem se apresentado como um dos maiores desafios sanitários em escala global deste século (WERNECK; CARVALHO, 2020). Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA fita simples, de sentido positivo, capazes de infectar vários hospedeiros (MASTERS, 2006). No início do século XXI, surgiram CoVs altamente patogênicos, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (CUI J *et al.*, 2019) e, no final de 2019, uma nova variante do SARS-CoV denominada Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) (LAM *et al.*, 2020).

Quando o SARS-CoV-2 infecta o ser humano, o corpo pode apresentar sintomatologia variada como tosse, febre, falta de ar, dor de garganta, mialgia e até mesmo pneumonia. A doença apresenta três níveis de gravidade: leve, moderada e grave (CERIBELLI *et al.*, 2020). Essa última pode avançar para a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), provocando disfunção nos pulmões, rins, coração, fígado (SINGHAL, 2020) e pode causar pneumonia em 14% dos pacientes doentes progredindo em 6% dos casos, agravando o quadro clínico (LIU *et al.*, 2020; MATTIUZZI *et al.*, 2020).

Na atual situação de crise mundial da saúde devido à falta de novas tecnologias terapêuticas, faz-se necessário a busca por estratégias de tratamentos alternativos com medicamentos naturais, vacinas naturais ou outros agentes terapêuticos para a redução da infecção viral e redução dos sintomas clínicos do novo coronavírus (SILVA E BORGES *et al.*, 2020). Os produtos naturais, incluindo alimentos, especiarias, plantas medicinais e produtos biotecnológicos são utilizados desde a antiguidade pelos povos do mundo inteiro para tratar diversas doenças incluindo doenças virais, além de serem os principais agentes bioativos percussores dos medicamentos e vacinas (BACK, 2020). O uso de plantas medicinais é uma alternativa relativamente menos custosa e de avaliação rápida devido aos conhecimentos empíricos já empregados (LIMA, 2020).

O Brasil é um país que se destaca quanto à riqueza de biodiversidade vegetal, trazendo consigo uma imensa fonte de metabólitos secundários com atividades anti-inflamatória já relatadas em testes prévios. Como é o caso da (epiisopiloturina, epiisopilosina e pilocarpina) extraídos das folhas do *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), um vegetal da Amazônia Legal (VERAS, 2014). A importância do uso desta planta reside na pesquisa e desenvolvimento da excelente capacidade farmacológica e biotecnológica (LIMA e SILVA *et al.*, 2015). Está entre as espécies que possuem maior desempenho economicamente, pois compreende altas

concentrações do alcaloide imidazol pilocarpina, usada para tratar glaucoma, estimular glândulas lacrimais e sudoríparas e para controlar a xerostomia (SANTOS e MORENO, 2004).

O jaborandi após passar pelo processo de extração da pilocarpina gera um substrato rico em diversos outros alcaloides, como a epiisopiloturina (EPI) e epiisopilosina (EPIL) (VERAS, 2014). EPI possui propriedades biológicas ainda desconhecidas; no entanto, este alcaloide foi isolado e já se encontra sob patente do governo brasileiro com base na atividade de potencial contra o verme *Schistosoma mansoni* adulto (LEITE E MIURA *et al.*, 2011). A EPIL assim como a EPI, já foi relatado atuando contra adultos de *S. mansoni* em camundongos infectados como também é um periférico estimulante do sistema nervoso parassimpático, além de já demonstrar baixa citotoxicidade em estudos *in vitro* (GUIMARÃES *et al.*, 2018).

Por não haver um tratamento antiviral específico (NETO & PIRES, 2020) e por se tratar de um vírus com rápida propagação e que não há um medicamento específico para prevenir ou até mesmo tratar o SARS-CoV-2, gerou preocupação e mobilização por parte dos pesquisadores (MELO *et al.*, 2021) para combater esta doença. A vista disso, a busca por moléculas em estudos *in silico* através da docagem molecular é um método antigo e que tem grande importância no processo de investigação de novos agentes terapêuticos (MUNIZ, 2018).

Desse modo, o estudo pretende avaliar o potencial anti SARS-CoV-2 elucidando os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos antiviral, *in silico* dos alcaloides pilocarpina, epiisopiloturina e epiisopilosina presentes na *P. microphyllus*. Além de simular interações moleculares destes alcaloides com proteínas não estruturais envolvidas no processo de replicação viral, através de docagem molecular. E com isso, poder contribuir com o conhecimento prévio/ computacional acerca das moléculas para que ensaios *in vitro* e *in vivo* possam ser consolidados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SARS-CoV-2 E A COVID-19

O vírus SARS-CoV-2 ou também conhecido como novo coronavírus, que causa a doença COVID-19, foi identificado em dezembro de 2019, além de ter sido responsável por uma série de casos de pneumonia na cidade chinesa de Wuhan (MORAIS *et al.*, 2021). Devido aos grandes números de pessoas infectadas a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou no dia 11 de março de 2020 como pandemia.

O novo coronavírus é um vírus de RNA envelopado, que possui uma alta taxa de transmissão (MORAIS *et al.*, 2019). A apresentação clínica pode variar de um quadro assintomático ou leve, até casos graves que cursam com insuficiência respiratória. Febre, tosse, dispneia, fadiga, mialgia generalizada e cefaleia são os sintomas comumente observados (CERIBELLI *et al.*, 2021). O principal meio de transmissão do novo CoVs, se dá por gotículas contaminadas da orofaringe de uma pessoa infectada para uma outra livre da infecção. A incubação média, é variável na literatura, com um período de 3 a 7 dias (MORAIS *et al.*, 2021), por conseguinte, sua transmissão é aumentada, principalmente, por pessoas assintomáticas.

Nos casos graves de infecções ocasionadas pelo o SARS-CoV-2 quando em contato com a mucosa pulmonar, causa quadros de SDRA (BARON; LEVY, 2016). A principal característica desta manifestação clínica se dá pelo acúmulo de neutrófilos na micro vasculatura pulmonar, interstício e espaço alveolar (WILLIAMS e CHAMBERS, 2014). Existem alguns debates sobre se os neutrófilos contribuem diretamente para a patogênese da doença, apesar da associação evidente entre o influxo de neutrófilos no pulmão e a gravidade desta condição. A função primária dessas células é fornecer defesa imediata do hospedeiro contra microrganismos patogênicos (LEONARD e YOSHIMURA, 2014).

Os neutrófilos liberam vários fatores antimicrobianos, como espécies reativas de oxigênio, proteinases e armadilhas extracelulares. Contudo, esses fatores também são citotóxicos para as células do hospedeiro e podem resultar em danos aos tecidos. O acúmulo excessivo de neutrófilos na SDRA pode, portanto, contribuir para a progressão da doença (WILLIAMS e CHAMBERS, 2014). Quando ocorre o recrutamento de neutrófilos, há liberação de quimiocinas incluindo o arquetípico quimioatraente de neutrófilos IL-8, a partir de células pulmonares residentes. No entanto, essa liberação no pulmão inflamado é complexa e pode envolver várias outras citocinas (GAGGAR *et al.*, 2008).

Ao entrar na célula, o vírus consegue suprir a resposta de Interferon gama, induz a aproximação e ativação de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) gerando inflamação do tecido pulmonar. Neste processo ocorre a resposta imune por subpopulações de linfócitos T (TH2/TH17) para produção de anticorpos contra o vírus (SINGHAL, 2020; SARZI-PUTTINI *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2021). Gera uma desregulação da produção e secreção de citocinas inflamatórias, que ficam aumentadas e esse aumento da atividade do sistema imune pode gerar danos em outros órgãos, disfunção e até morte (SARZI-PUTTINI *et al.*, 2020; YI *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2021).

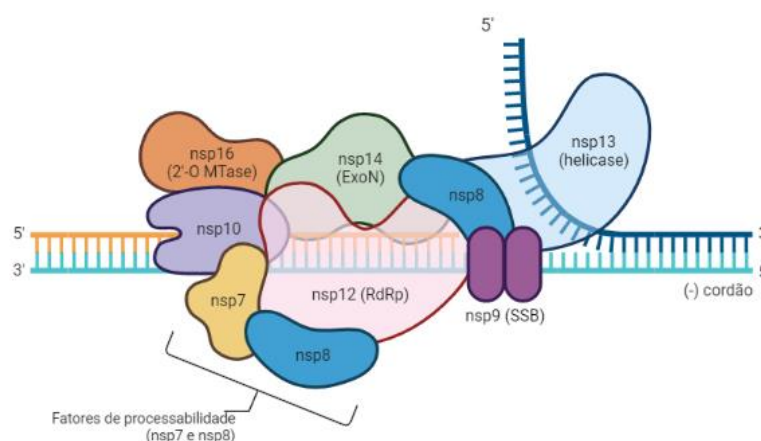
O SARS-CoV-2 usa o receptor ACE2 (Enzima Conversora de Angiotensina Humana 2) encontrado nos pneumócitos tipo II para entrada nas células através da ligação com as glicoproteínas de superfície (SINGHAL, 2020; YE *et al.*, 2020; GUI *et al.*, 2020; GIWA *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2020; MORAIS *et al.*, 2021). Assim, o ciclo de replicação do vírus, inicia-se com a interação da glicoproteína S que está localizada no envelope viral – com o receptor celular ACE-2 (DE ALMEIDA *et al.*, 2020). Este processo concentra-se na transcrição e tradução inicial do RNA genômico em uma poliproteína pioneira, que é formada em proteínas não estruturais, estas proteínas não estruturais (nsp) formadas participam da replicação, excepcionalmente, nas etapas do complexo replicação-transcrição (RTC), na montagem de novos vírions e no suporte à RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) para iniciar a transcrição de uma fita simples de RNA negativo, a partir do RNA genômico viral (GAO YAN *et al.*, 2020).

Durante o processo de replicação e transcrição do genoma viral (Figura 1) há a constituição de um complexo de réplicas ligados à membrana, formado por 16 proteínas não estruturais virais realizando muitas atividades enzimáticas (RICAGNO *et al.*, 2006). Dentre estas proteínas, está a nsp1 (CoV1) responsável por gerar a degradação do mRNA (RNA mensageiro) celular, bloquear a tradução celular hospedeira e impedir a resposta imune inata pela infecção do vírus. Esta proteína possui um papel importante no ciclo de vida do novo coronavírus, permitindo que este vírus tenha capacidade de infectar ainda mais células (CLARK *et al.*, 2021). A proteína nsp14 é responsável por exercer função no processo de revisão da síntese de RNA viral, além de participar da evasão do sistema imune (NICHOLAS *et al.*, 2022). Uma outra proteína não estrutural importante na transcrição e replicação viral, é a nsp 15, uma endonuclease de RNA, que é mantida entre nidovirus, que a torna um marcador genético desta ordem do vírus (RICAGNO *et al.*, 2006).

A RdRp do novo coronavírus, é constituído pela subunidade catalítica nsp12, além de mais duas subunidades acessórias, nsp8 e nsp7 (SUBISSI *et al.*, 2014). Para que ocorra a

replicação de RNA codificado pelo vírus, a partir de uma cópia do genoma de RNA da SARS-CoV-2, a proteína não estrutural 12 (nsp12) é o componente principal para esse processo (AHN *et al.*, 2012). Contém um domínio à direita e um domínio de extensão n-terminal para nidovirus RdRp que assume uma arquitetura nucleotidyltransferase (NiRAN) associada a nidovirus (HILLEN *et al.*, 2020). O domínio à direita assemelha-se a uma mão direita, juntamente com os dedos e a palma e polegar sendo os subdomínios, estes são achados em todas as polimerases de subunidade única. As subunidades nsp7 e nsp8 conectam ao polegar, e uma cópia de nsp8 se liga ao domínio dos dedos. (HILLEN *et al.*, 2020).

Figura 1- Proteínas não estruturais (nsp) envolvidas no processo de transcrição e replicação do SARS-CoV-2



Fonte: Biorender, 2022.

O diagnóstico da COVID-19 tem sido feito a partir de exames moleculares específicos, baseado em biomarcadores atrelados ao próprio vírus pelo material genético; teste padrão-ouro RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real); por testes sorológicos por procura de anticorpos e antígenos virais, e pela alteração na concentração de biomarcadores de órgãos atingidos pelo vírus (FIGUEIREDO; PAULA, 2022). Para o tratamento, é recomendável o uso apenas de corticosteroides e profilaxia para tromboembolismo (FALAVIGNA *et al.*, 2022).

O uso de remédios caseiros ainda é uma alternativa bastante utilizada para tratar doenças mais comuns, e que durante a pandemia se intensificou com o intuito de prevenir e curar os sintomas do novo coronavírus (ANDRADE, 2022). E mesmo com a criação da vacina, e consequentemente, controle da transmissão e dos casos de complicações graves, é

transcendente a procura de novos farmoquímicos, extraídos de plantas para o combate de doenças virais, como para o SARS-CoV-2.

2.2 INFLAMAÇÃO PULMONAR

Todos os organismos vivos, possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático (VOLTARELLI, 1994). Nos vertebrados, esta resposta inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas coletivamente denominadas inflamação (VOLTARELLI, 1994). É um processo natural e essencial do corpo (ROCHA, 2017). Há dois tipos de mecanismo envolvidos no processo da inflamação, a resposta imune inata, sendo mecanismo de defesa não específico, com ação geral sobre os microrganismos, independentemente de sua natureza (MENDONÇA *et al.*, 2008). Quando se trata da resposta imune adaptativa, está se caracteriza por apresentar mecanismos que se baseiam no reconhecimento específico de antígenos, mediado por receptores presentes nas membranas dos linfócitos T e B. Classicamente a resposta imune adaptativa pode ser categorizada em celular ou do tipo 1, e humoral ou do tipo 2 (MENDONÇA *et al.*, 2008).

Na grande maioria das vezes, a reação inflamatória age localmente no sentido de restringir as consequências e a extensão do dano tecidual, nestes casos, o processo inflamatório tem apenas repercussões locais (VOLTARELLI, 1994) e a restauração do tecido lesionado acontece naturalmente (WATSON, 2006; ROCHA, 2017). Porém, em condições anormais promovem perda da função do órgão ou tecido, e a cronicidade nesta resposta, induz ao desenvolvimento de doenças (LAWRENCE *et al.*, 2002; ROCHA, 2017). A vista disso, a resposta inflamatória pode se tornar um componente fisiopatológico que contribui para o surgimento de doenças como obesidade, câncer, doença pulmonar, asma, doenças inflamatórias intestinais e artrite reumatoide (DUCAN *et al.*, 2012; HEADLAND e NORLING, 2015; ROCHA, 2017).

Como uma superfície mucosa, o pulmão está na interface entre os ambientes externos e internos e está continuamente exposto a uma variedade de materiais estranhos, incluindo patógenos, partículas e tóxicos (GUTTENBERG *et al.*, 2021). A mucosa respiratória é um sistema de defesa multicomponente, composto de líquido e muco da superfície das vias aéreas, junções herméticas de células epiteliais e receptores imunológicos, que serve como barreira para poluentes ambientais, irritantes e patógenos (GEORAS; REZAEI, 2014). A perda das funções de barreira epitelial ou a modificação das respostas epiteliais podem facilitar a

penetração de partículas ou patógenos nos espaços aéreos distais e levar a danos nos tecidos (GUTTENBERG *et al.*, 2021).

A inflamação pulmonar pode apresentar manifestações variadas, dependendo do compartimento afetado, incluindo vias aéreas, vasculatura ou interstício (SCHERER e CHEN, 2016). Embora as mudanças de densidade nos pulmões em si não sejam específicas para a inflamação, os padrões característicos podem ser úteis para distinguir a inflamação de outros processos (SCHERER e CHEN, 2016). As doenças predominantes das vias aéreas frequentemente envolvem a infiltração dos alvéolos e ductos alveolares com células inflamatórias, detritos ou fluidos (LOUREIRO *et al.*, 2020). Quando os espaços alveolares são preenchidos com fluido por meio de capilares com vazamento, implicam na SDRA que é a manifestação clínica de dano alveolar difuso causado por lesão pulmonar direta ou indireta (AMATO *et al.*, 2007).

As doenças inflamatórias pulmonares com sua alta morbidade e mortalidade, representam uma carga socioeconômica significativa para a sociedade (SCHERER e CHEN, 2016). Existem poucas terapias eficientes para doenças respiratórias aprovadas para uso. Um dos principais fatores que auxiliam neste fato é a falta de biomarcadores que quantificam com precisão a carga inflamatória pulmonar a serem usados para entender a contribuição da inflamação pulmonar para a perda da função pulmonar (CAIXETA; LOPES 2022). Sendo a SDRA uma das manifestações clínicas mais graves da COVID-19 (MORAIS *et al.*, 2021).

2.3 *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew

Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas com base científica, resultando no isolamento de alguns princípios ativos já então conhecidas como medicinais (MONTANARI e BOLZANI, 2001). A partir desses estudos, foram obtidas algumas substâncias conhecidas como princípios ativos eficazes e que, até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina, cânfora e cocaína (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth,) (Figura 2) é o nome popular dado as espécies de plantas pertencentes ao gênero *Pilocarpus* e família *Rutaceae*. As árvores de jaborandi são pequenos arbustos verdejantes, bem ramificados e apresentam tamanho entre 1–6 metros (CALDEIRA *et al.*, 2017; SOUSA, 2021). Muito encontradas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente nos estados do Maranhão, Pará, Piauí e Bahia,

compreendendo fortes incidências em áreas desmatadas. (FREITAS *et al.*, 1992; HOMMA; MENEZES, 2014; CARVALHO *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; SOUSA, 2021). Fazem parte das fontes de produtos naturais de plantas nativas, que mais são utilizadas pelas empresas farmacêuticas internacionais (BRANDAO, ZANETTI *et al.*, 2008) e que movimentam a economia, sendo consideradas uma das mais importantes da flora brasileira (SANTOS e MORENO, 2004).

Figura 2-Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth)



Fonte: Vêraz, 2014.

De suas folhas é extraída a Pilocarpina – alcaloide já usado no tratamento do glaucoma administrado na forma líquida e também na xerostomia em forma de comprimido (VÉRAZ, 2014). Alcaloides são metabólitos secundários de cunho básico, que podem ser encontrados em plantas, bactérias, fungos e animais. Na sua estrutura química é encontrado oxigênio, nitrogênio e carbono, podendo alterar a atividade metabólica biológica, e também possuem uma importância social, econômica, política, na fonte de medicamentos (HENRIQUES, KERBER *et al.*, 2002).

No processo de pós-extração da planta para a obtenção de pilocarpina é formado uma biomassa contendo outros alcaloides que podem exercer atividade no organismo, porém ainda necessitam de estudos mais desenvolvidos (VÉRAZ, 2014). A partir deste substrato, são encontrados vários outros alcaloides como: isopilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpidina, pilosina, isopilosina, epiisopilosina, epiisopiloturina, 13-nora-7(11) -de-hidro-pilocarpina, N, Ndimetil-5-metoxi-triptamina, N, N-dimetiltriptamina, plastidesmina, (1H) -4-metoxi-2-quinolone e dictamina (SANTOS e MORENO, 2004; VÉRAZ, 2014). Sendo, a epiisopiloturina (EPI), o mais detectado (MIURA, 2009).

A pilocarpina, atua como um agente parassimpaticomimético colinérgico que desenvolve estímulos diretos para a produção de secreções em glândulas sudoríparas, lacrimais, salivares e mucosas respiratórias (FOX *et al.*, 1986; SIDHU, 2014; CALDEIRA *et al.*, 2017; SOUSA, 2021). Em estudos com ratos, a epiisopilosina mostrou causar redução do estado consciente e disposição, e também da atividade motora e tônus muscular, provocando convulsões e ereções da cauda, além de estimular a salivação em doses acima de 120 mg/kg (LUCIO, 2002; MIURA, 2009; ROCHA, 2017). Atualmente a literatura informa que a EPI demonstrou ter atividade antinociceptiva (ROCHA, 2017) anti-helmíntica (GUIMARÃES *et al.*, 2015) anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2013) e antioxidante (CARVALHO, 2018). Além de possuir grande potencial para tratar infecções causadas por *S. mansoni* (VERAS e GUIMARÃES *et al.*, 2012).

O Brasil é um país detentor de uma biodiversidade rica de produtos naturais, possuindo um grande repertório (MONTANARI e BOLZANI, 2001). Porém, as pesquisas com plantas ainda estão muito focadas nas Universidades e Institutos de Pesquisa onde se executa basicamente a fotoquímica tradicional. Apesar da existência de grupos de pesquisa compreendidos na procura de princípios bioativos, essa busca é limitada à área acadêmica. Não deixa de ser uma colaboração positiva, pois são pesquisas que demandam tempo e que envolve qualificação de recursos humanos (MONTANARI e BOLZANI, 2001). A vista disso, não resta questionamentos sobre a competência científica nacional em estar preparada para atuar no processo de descoberta de novos fármacos, no entanto, há pouco investimento por parte da indústria farmacêutica brasileira.

A *P. microphyllus* Stapf ex Wardleworth por ser a única espécie com eficiência econômica para a extração de pilocarpina, tem um valor elevado economicamente (ABREU *et al.*, 2007; CALDEIRA *et al.*, 2017; SOUSA, 2021). O grande interesse da indústria farmacêutica pela pilocarpina se deve pela eficácia e segurança do uso deste alcaloide para o tratamento de glaucoma e xerostomia (GUIMARÃES *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2018; PANARESE; MOSHIRFAR, 2020; SOUSA, 2021). Esta planta é utilizada desde muito tempo pela população indígena da Amazônia, tendo em vista que os povos indígenas foram os primeiros a notarem que as folhas de jaborandi têm propriedades estimulantes para desencadear a produção de suor e saliva (CALDEIRA *et al.*, 2017; SOUSA 2021). O chá das folhas é usado para tratar febre, estomatite e também como antídoto contra venenos e toxinas. Através dos costumes indígenas sob a espécie foram repassadas por gerações e se fixou no Brasil, facilitando o uso desta planta na medicina popular (HOLMSTEDT; WASSEN; SCHULTES, 1979; CALDEIRA *et al.*, 2017; SOUSA 2021). Na literatura, há evidências de plantas que possuem

potencial atividade antiviral contra o novo coronavírus, mas ainda é muito deficiente de estudos que comprovem a ação desta atividade.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial anti Sars-CoV-2, elucidando parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos antiviral, *in silico* dos alcaloides pilocarpina, epiisopiloturina e epiisopilosina presentes na *P. microphyllus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar os ligantes pilocarpinas, epiisopiloturina e epiisopilosina através do método B3LYP/6-311⁺⁺;
- Aferir parâmetros farmacocinéticos relacionados a administração, distribuição, excreção e metabolismo dos alcaloides, bem como suas toxicidades;
- Avaliar a farmacodinâmica antiviral dos alcaloides;
- Simular interações moleculares entre os ligantes pilocarpinas, epiisopiloturina e epiisopilosina com proteínas envolvidas no processo de replicação viral do Sars-Cov-2;

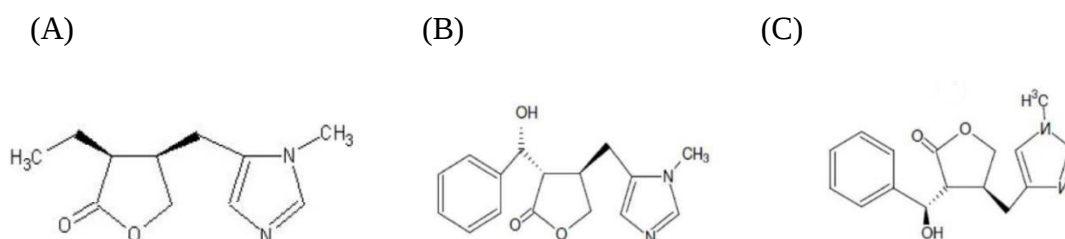
4.METODOLOGIA

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS LIGANTES

O método híbrido B3LYP é um dos métodos mais adequados e apropriados para o estudo de cálculos de energias, visto que o mesmo possibilita elucidar as propriedades eletrônicas, estruturais e espectrais, intrínsecas das moléculas, com precisão (FRANCISCO, 2017; AHMAD *et al.*, 2018; SOUSA, 2022).

As estruturas 2D (Figura 3) dos ligantes (pilocarpina, epiisopiloturina e epiisopilosina) foram construídas com o software MarvinSketch, enquanto que para o desenho 3D das estruturas utilizou-se os softwares GaussView 5 e Gaussian 09w (FRISCH *et al.*, 2009). As moléculas foram otimizadas com base na Teoria do Funcional da Densidade (DFT) (STRATMANN *et al.*, 1997) com a função híbrida B3LYP (JAIN *et al.*, 2004) e base 6-311G⁺⁺ (COLLINS *et al.*, 1976). Após isso, as estruturas otimizadas foram utilizadas para as demais análises *in silico*.

Figura 3- Estrutura química da pilocarpina (A); epiisopiloturina (B) e epiisopilosina (C).



Fonte: Rocha, 2017.

4.2 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

O ADMET *in silico* é uma ferramenta da bioinformática adequada e amplamente utilizada nos estudos de propriedades farmacocinéticas de moléculas. Os resultados obtidos, a partir desta análise, podem fornecer dados relativos as propriedades biológicas e químicas destas moléculas (ROCHA *et al.*, 2018; SOUSA, 2022). Esta ferramenta é bastante utilizada pelo fato de diminuir gastos com ensaios biológicos realizados com moléculas que possivelmente, poderiam não apresentar nenhum potencial para uma determinada finalidade

terapêutica, consequentemente, economizando investimentos e tempo de muitos pesquisadores. (ROCHA *et al.*, 2018; SOUSA, 2022).

Os parâmetros farmacocinéticos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/Tox.) da pilocarpina, epiisopiloturina e epiisopilosina foram obtidos usando o servidor online pkCSM (PIRES E BLUNDELL *et al.*, 2015). Nessas análises, as propriedades físicoquímicas, a lipofilicidade, solubilidade em água, o potencial de absorção intestinal humana (HIA), a capacidade de absorção do fármaco (PCaco2), a permeabilidade da pele (PSkin), o potencial de cruzar a barreira hematoencefálica, a possível reação com a glicoproteína-P foram considerados para absorção e distribuição. A eficiência de inibição com as subfamílias CYP450 foi utilizada como parâmetro do metabolismo do fármaco e a avaliação da excreção renal OCT2 como parâmetro de excreção do fármaco. Além disso, avaliação toxicológica sobre a hepatotoxicidade, mutagenicidade pelo teste de AMES, inibição de hERG foram utilizadas como parâmetros referentes à toxicidade do composto (KHAN *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2018; DURÁN-ITURBIDE; DÍAZ-EUFRACIO; MEDINA-FRANCO, 2020; ARAÚJO *et al.*, 2021, SOUSA, 2022).

4.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN SILICO*

O AntiVir-Pred estima a probabilidade de que um determinado composto tenha a probabilidade de pertencer às classes particulares de compostos ativos sobre alguma atividade biológica antiviral. Ajuda a identificar os ensaios biológicos específicos, nos quais os compostos devem ser estudados (WAY2DRUG, 2011).

A atividade antiviral dos alcaloides foi avaliada a partir do servidor online Way2Drug AntiVir-Pred. Nesta análise, foram gerados os códigos SMILES de cada um dos alcaloides selecionados neste estudo. Desse modo, foi avaliado a potencial atividade dos alcaloides em inibir proteínas virais, sendo que os maiores índices de confiança gerados pela análise foram considerados como os mais favoráveis (WAY2DRUG, 2011).

4.4 DOCAGEM MOLECULAR

A docagem molecular é um método que utiliza programas (softwares) de computadores para interagir um ligante a um receptor, afim de conhecer a energia de ligação entre ambos, é neste método que se conhece se haverá interação do ligante ao sitio ativo do receptor (MUNIZ, 2018). Esta ferramenta tem ampla utilidade para entender como as ligações químicas, as

estruturas e as posições dos ligantes nos complexos ligante-receptor podem induzir ou bloquear uma determinada atividade biológica a partir da energia livre de Gibbs construída no sistema (ROCHA *et al.*, 2018; SOUSA, 2022).

As estruturas 3D dos alvos proteicos de SARS-CoV-2 foram obtidas a partir do Protein Data Bank (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000) com o código PDB ID: 6YYT (nsp12), 7K7P (nsp1), 2H85 (nsp14) e 7MC5 (nsp15), são proteínas não estruturais que fazem parte do processo de transcrição e replicação do vírus. Todos os procedimentos de encaixe utilizaram o pacote Autodock 4.2 (GOODSELL; MORRIS; OLSON, 1996; GOODSELL, 2005; MORRIS; HUEY; OLSON, 2005). Proteínas e ligantes foram preparados para simulações de docagem com o AutoDock Vina (SANNER, 1999). O receptor foi considerado rígido; cada ligante foi considerado flexível. As cargas parciais de Gasteiger (GASTEIGER, 1980) foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios de queda. Os átomos de hidrogênio não polares das proteínas e dos ligantes foram posteriormente mesclados. Uma caixa cúbica de $25 \times 25 \times 25$ pontos foi gerada para o alvo de proteína (ROCHA *et al.*, 2018). Outros parâmetros de encaixe foram definidos como valores padrão. As conformações ancoradas resultantes foram agrupadas em famílias de acordo com o RMSD. Para uma análise mais detalhada, as coordenadas dos complexos selecionados foram escolhidas pelo critério de menor conformação de encaixe do cluster com menor energia em combinação com uma inspeção visual.

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

A análise farmacocinética da pilocarpina, epiisopilosina e epiisopiloturina são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Propriedades farmacocinética dos alcaloides

Propriedade	Pilocarpina	Epiisopilosina	Epiisopiloturina
Solubilidade em água	-1.806 log/mol/L	-2,931 log/mol/L	-3,122 log/mol/L
Permeabilidade Caco2	1.225 log Papp in 10 ⁻⁶	0,52 log Papp in 10 ⁻⁶	1.215 log Papp in 10 ⁻⁶
Absorção Intestinal humana	96.98 %	91.396 %	98.054 %
Permeabilidade na pele	-2.919 log Kp	-2,737 log Kp	-2,745 log Kp
Substrato de glicoproteína P	Não	Sim	Não
Permeabilidade BBB	-0.168 log/BB	0.033 log/BB	-0.125 log/BB
Substrato CYP2D6	Não	Não	Não
Substrato CYP3A4	Não	Sim	Não
Substrato CYP1A2	Não	Sim	Sim
Substrato CYP2C19	Não	Não	Sim
Substrato CYP2C9	Não	Não	Não
Substrato CYP2D6	Não	Não	Não
Substrato CYP3A4	Não	Não	Não
Substrato renal OCT2	Não	Sim	Não
Toxicidade AMES	Sim	Sim	Sim
Inibidor hERG I	Não	Não	Não
Inibidor hERG II	Não	Sim	Sim

Fonte: Biosig, 2022.

Os alcaloides apresentaram baixa solubilidade em água (25°C), alta permeabilidade intestinal humana (>90%), e para permeabilidade pelas Caco2 (>0,90 log Papp in 10⁻⁶), a pilocarpina e epiisopiloturina demonstram que a partir dos valores preditos, podem ser candidatos à administração oral. Quanto a permeabilidade dérmica (>-2,5 log Kp), as moléculas possuem pouca capacidade de permeação, de acordo com os valores calculados, o que pode interferir no desenvolvimento de medicamentos transdermais, indicando que estes compostos possuem uma certa permeabilidade transdérmica, mas não sendo caracterizado como substância com alta permeação na pele (VIEIRA *et al.*, 2014; SOUSA 2022).

Os três alcaloides são permeáveis à barreira hematoencefálica (< 0,3), o que pode causar efeitos colaterais indesejáveis, mas que tem seu valor quando o alvo principal do desenvolvimento de um medicamento é o cérebro (DUARTE, 2020). Somente a epiisopilosina demonstrou ser substrato de glicoproteína P, proteína está essencial para o processo de absorção, distribuição, metabolização e excreção de vários fármacos (ROCHA *et al.*, 2018; SOUSA 2022). Em um estudo de ARAÚJO (2015) verificou que moléculas que tem capacidade de inibir a função da glicoproteína P, consegue fazer com que biodisponibilidade destas sejam aumentadas intracelularmente, com isso, a pilocarpina e EPI possuem este potencial.

O citocromo P450 é responsável por ações de oxidação, redução, hidroxilação e hidrólise de diversas moléculas (MODA, 2011). A pilocarpina não demonstrou reações com esta família, isso indica possivelmente que este composto não tem capacidade de ser acumulado no corpo e consequentemente não ter efeito prolongado no organismo, além de não ter capacidade de inibir o processo de metabolização (ROCHA *et al.*, 2018). Ao contrário da EPIL que apresentou ser inibidores de CYP3A4, CYP1A2 e a EPI para CYP2C19. As principais isoformas de P450 responsáveis pelo metabolismo de drogas são CYP2D6 e CYP3A4 (BIOSIG, 2022) o que para estas moléculas, somente a EPIL mostrou-se ser inibidor o que pode levar, consequentemente, ao impedimento no processo de biotransformação e eliminação (SOUSA, 2022).

Em muitos estudos, a pilocarpina apresentou pouca seletividade de atuar no órgão ou tecido alvo da terapêutica. Quando utilizado para tratamento de xerostomia, atua nas glândulas salivares, promove aumento do fluxo salivar, porém também provoca muitos efeitos adversos, como sudorese, calafrios, dores de cabeça, vômito, náuseas são relatados (ALMEIDA; KOWALSKI, 2010; BRIMHALL; JHAVERI; YEPES, 2013; GUSMÃO, 2018). Uma alternativa viável para o uso controlado deste alcaloide, seria de forma tópica e local (GUSMÃO, 2018).

Quanto a excreção renal pelo transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), em que este substrato desempenha papel fundamental na disposição e desobstrução renal de drogas principalmente catiônicas e compostos endógenos (SOLVO BIOTECHNOLOGY, 2022) somente a EPIL não é substrato, enquanto a pilocarpina e EPI indicam exceção renal.

Os testes de hepatotoxicidade demonstram que os três compostos não têm capacidade de causar danos ao fígado, ainda estes alcaloides para toxicidade AMES possuem potencial carcinogênico. Em estudos de (ROCHA *et al.*, 2018; ROMAN *et al.* 2019) através de testes específicos, evidenciaram que a EPIL não possui potencial em causar danos ao material genético.

Em relação as interações com os inibidores hERG, que é um gene responsável por codificar a produção de subunidade proteica de canais de potássio, os resultados preditos apontam que a EPIL e EPI possui ação para hERG II, tendo potencial capacidade em danificar os canais de potássio importantes no funcionamento elétrico do coração (SANTANA; MIRANDA; SOUSA, 2020). Já a pilocarpina, foi o alcaloide que não apresentou inibição para este gene.

Portanto, os parâmetros farmacocinéticos avaliados revelam que os compostos dispõem de características que podem ser aperfeiçoadas para melhorar estas propriedades.

5.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN SILICO*

A atividade farmacodinâmica antiviral da pilocarpina, epiisopilosina e epiisopiloturina é apresentada logo abaixo, na Tabela 2.

Tabela 2- Propriedades da farmacodinâmica antiviral dos alcaloides

Vírus	Pilocarpina	Epiisopilosina	Epiisopiloturina
*Vírus da Imunodeficiência Humana 2	0.1179 Proteína pol	0.0923 Proteína pol	0.1004 Proteína pol
*Virus varicela - zóster (cepa Dumas) (HHV-3) (herpesvírus 3)	0.1048 DNA polimerase		0.0671 DNA polimerase
*Virus Herpes simples (tipo 1 /cepa 17)	0.1048 DNA polimerase		0.0671 DNA polimerase

*Rinovírus sp. Humano	0.0233 Protease A	
*Herpesvirus Macanice 1	0.0215 Timidina quinase	0.0115 Timidina quinase
*Coronavirus relacionado à síndrome respiratória do Oriente Médio (isolado United Kingdom)/ H12399006/2012) (Betacoronavirus England 1) (Humancoronavirus EMC)	0.0959 Replicase poliproteína 1ab	

*Obtidos com a plataforma WayDrug, AntiVirPred.

Fonte: WayDrug, 2022.

De acordo com os resultados obtidos da plataforma AntiVirPred, tanto a pilocarpina, a EPIL e a EPI demonstraram atividade biológica antiviral sobre a proteína Pol do vírus da imunodeficiência humana 2. Para mais, a pilocarpina e EPI demonstraram atividade biológica também para Herpes vírus 3 e Herpes vírus simples 1. Já a EPIL revelou atividade antiviral sobre o Rinovírus e juntamente com a epiisopiloturina para Herpes virus macanice 1.

Fonseca (2019) relatou que muitos metabólicos secundários extraídos de plantas já possuem ação frente a muitas doenças virais, por atuarem diretamente na atividade biológica, comprometendo nos diferentes estágios do ciclo de replicação dos vírus. Neste contexto, os alcaloides revelaram ter ação sobre proteínas virais importantes para o processo de replicação, tendo capacidade em impedir no ciclo de vida destes vírus, desta forma, presidindo elevada capacidade em inibição na progressão de doenças virais.

5.3 DOCAGEM MOLECULAR

5.3.1 Pilocarpina

Os alcaloides foram otimizados e apresentaram estabilidade com o método teórico B3LYP/6311G++. Em um estudo de (ROCHA *et al.*, 2018) foi descrito que a EPI é o alcaloide mais estável do jaborandi quando comparada com a epiisopilosina, isopilosina e pilosina, por conta de sua conformação trans.

Os resultados referentes ao acoplamento molecular do composto pilocarpina com as proteínas não estruturais 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5 do processo de replicação do COVID-19 são apresentados na Tabela 7.

Tabela 3- Parâmetros de afinidade molecular do composto pilocarpina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5.

Complexo (Ligante-Proteína)	ΔG_{bind}^a (kcal.mol ⁻¹)	Aminoácidos que interagem através de ligação de hidrogênio ^b	Aminoácidos que realizam interação hidrofóbica ^b
Pilocarpina-6YYT	-6.6	Leu723 (A), Ala747 (A)	Phe741 (A), Glu744 (A), Leu749 (A), Tyr748 (A), Asn743 (A)
Pilocarpina-7K7P	-4.2	Val51 (B), Leu52 (B), Gly50 (B), Glu82 (B)	Pro53 (B), Val47 (B), Glu48 (B), Lys49 (B)
Pilocarpina-2H85	-6.1	Lys70 (A), Asp296 (A)	Lys276 (A), Val294 (A), Ser197 (A), Lys89 (A), Ile295 (A), Asp199 (A), Arg198 (A), Asp272 (A), Thr195 (A)
Pilocarpina-7MC5	-4.7	Thr12 (M)	Asn63 (A), Gln36(A), Tyr30 (M), Gly34 (M), Ser33 (M), Gly35 (M), Gln65 (A), Tyr64 (A)

^a Energia na melhor conformação; ^bObtidos com o programa Ligplot.- software.

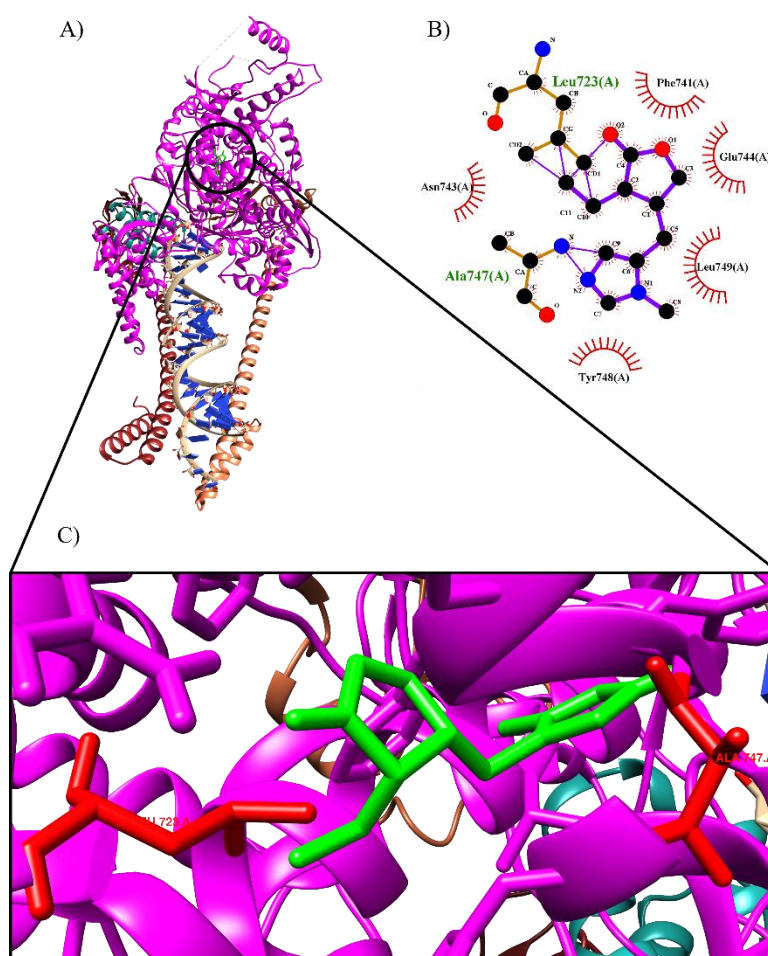
Fonte: Próprio autor, 2022.

Os parâmetros de afinidade molecular mostram que a pilocarpina apresenta interações com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85 e 7MC5. O melhor parâmetro de afinidade, para este alcaloide, foi obtido partir da interação entre o ligante pilocarpina com a proteína 6YYT. A afinidade foi observada com energia de ligação igual a -6.6 kcal.mol⁻¹ (Tabela 7; Figura 2). As interações por ponte de hidrogênio entre Leu723 (A) e Ala747 (A) permitem que o complexo ligante-proteína se torne mais estável.

A baixa energia livre de ligação necessária para esta interação promove uma melhor afinidade para formação deste complexo (VERMA *et al.*, 2012; SOUSA, 2022). As interações hidrofóbicas também contribuem para esta baixa energia livre. A proteína não estrutural 12 ou

nsp12 (6YYT) está envolvida na etapa de replicação do novo coronavírus. É a primeira proteína não estrutural a ser codificada, que faz parte da constituição de RdRp, além de ser catalisador de RNA replicase (DAE *et al.*, 2012). Indicando assim, o grande potencial da pilocarpina de bloquear a ação desta proteína e levar a não replicação viral.

Figura 4-Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 6YYT e o ligante pilocarpina ilustrando o sitio de ligação ativo (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B e C).



Fonte: Próprio autor, 2022.

Além disso, interações moleculares com energias de ligação de $-4,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$, $-6,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ e $-4,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ entre a pilocarpina foram observadas com as proteínas 7K7P, 2H85 e 7MC5, respectivamente. A junção gerada pelas interações moleculares demonstrou o impedimento da atividade das proteínas não estruturais que o ligante pode causar, com isso, o composto pode diminuir as chances do vírus de infectar células devido a interação com a proteína 7K7P (nsp1) (CLARK *et al.*, 2021), além de diminuir a replicação de alta fidelidade do vírus que é mediada por uma exoribonuclease, como foi comprovado com a interação do

ligante com a proteína 2H85 (nsp14) (NICHOLAS, et al., 2022). Para mais, o complexo formado por pilocarpina com a proteína 7MC5 (nsp15), apresenta boa interação, em que esta proteína tem função de abrigar uma endonuclease crítica na replicação do novo coronavírus (RICAGNO *et al.*, 2006).

5.3.2 Epiisopilosina

Os resultados referentes ao acoplamento molecular do composto epiisopilosina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5 do processo de replicação do COVID-19 são apresentados na Tabela 8.

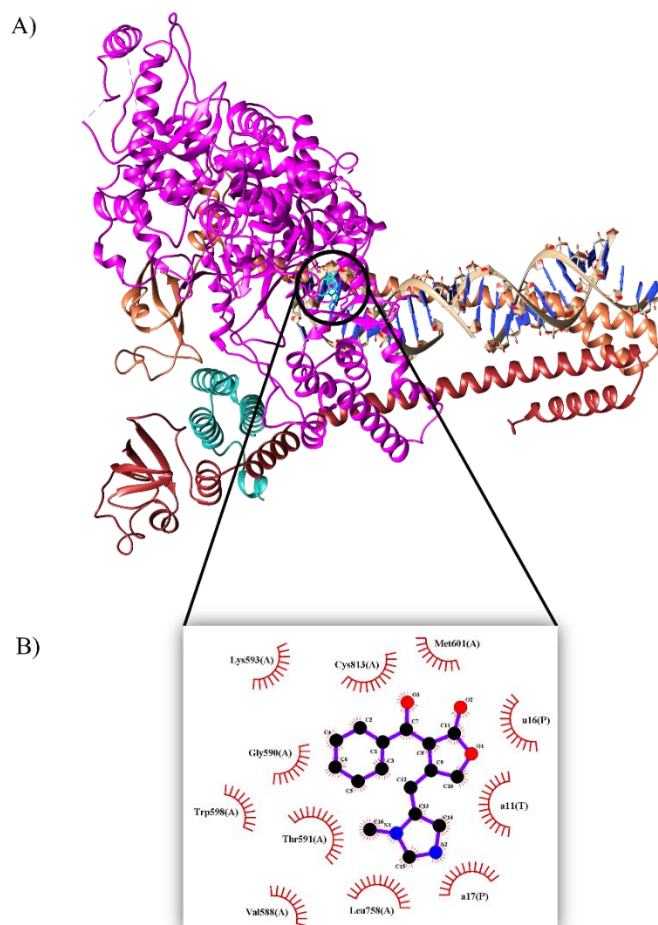
Tabela 4- Parâmetros de afinidade molecular do composto epiisopilosina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5.

Complexo (Ligante-Proteína)	ΔG_{bind}^a (kcal.mo l ⁻¹)	Aminoácidos que interagem através de ligação de hidrogênio ^b	Aminoácidos que realizam interação hidrofóbica ^b
Epiisopilosina- 6YYT	-8.3	-	Met601 (A), u16 (P), a11 (T), a17 (P), Leu758 (A), Thr591 (A), Val588 (A), Trp598 (A), Gly590 (A), Lys593 (A), Cys813 (A)
Epiisopilosina- 7K7P	-5.0	Leu52 (B)	Pro53 (B), Tyr59 (B), Val47 (B), Glu48 (B), Lys49 (B), Gly50 (B)
Epiisopilosina- 2H85	-7.2	-	Arg198 (A), Ser197 (A), Asp199 (A), Glu68 (A), Thr166 (A), Ile69 (A), Lys89 (A), Asp87 (A), Asp272 (A), Lys276 (A)
Epiisopilosina- 7MC5	-6.4	Asn105 (M), Lys133 (M)	Thr102 (M), Cys103 (M), Phe110 (M), Asp106 (M), Gly109 (M), Pro37 (M), Leu31 (M),

^a Energia na melhor conformação; ^b Obtidos com o programa Ligplot- software.

Os parâmetros de afinidade molecular demonstram que a epiisopilosina tem interação com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85 e 7MC5. A melhor afinidade, para a EPIL, foi observada com a proteína 6YYT (nsp12), igual para pilocarpina. Com energia de ligação igual a $-8.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (Tabela 8; Figura 3). O vírus, ao penetrar na célula do hospedeiro por endocitose, acontece fusão entre envelope viral com a membrana do endossomo, por ser um ambiente ácido ocorre desnudamento e consequente liberação do genoma viral no citoplasma da célula. A fita de RNA senso positivo é ligeiramente traduzida e esta tradução inicial dá origem a duas poliproteínas (pp1a e pp1b) (FIUZA *et al.*, 2020). É na pp1b que contêm 16 proteínas não estruturais e entre elas encontra-se a nsp 12 (6YYT) que constitui o RdRp, responsável por iniciar a transcrição de uma fita simples de RNA negativo, a partir de RNA genômico viral (ALMEIDA *et al.*, 2020). A vista disso, o complexo formado entre EPIL e a proteína 6YYT tem propriedade de bloquear o processo de replicação do vírus.

Figura 5-Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 6YYT e o ligante epiisopilosina ilustrando o sitio de ligação ativo (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B).



Fonte: Próprio autor, 2022.

5.3.3 Epiisopiloturina

Os resultados referentes ao acoplamento molecular do composto epiisopiloturina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5 do processo de replicação do COVID-19 são apresentados na Tabela 9.

Tabela 5- Parâmetros de afinidade molecular do composto epiisopiloturina com as proteínas 6YYT, 7K7P, 2H85, 7MC5.

Complexo (Ligante-Proteína)	ΔG_{bind}^a (kcal.mol ⁻¹)	Aminoácidos que interagem através de ligação de hidrogênio ^b	Aminoácidos que realizam interação hidrofóbica ^b
Epiisopiloturina-6YYT	-7.0	Asn691 (A), Asp623 (A), Arg555 (A), Ser682 (A), g8 (T)	Lys545 (A), g18 (P), Thr687 (A), Asp760 (A), Cys622 (A)
Epiisopiloturina-7K7P	- 5.1	Arg90 (B), Gly89 (B), Gln87 (B)	Lys63 (B), Ser91 (B)
Epiisopiloturina-2H85	- 7.2	Asp272 (A)	Lys276 (A), Asp199 (A), Arg198 (A), Ser197 (A), Lys89 (A), Thr166 (A), Glu68 (A), Ile69 (A), Lys70 (A), Ser273 (A), Tyr278 (A)
Epiisopiloturina-7MC5	- 6.6	His95 (A), Asn104 (A), Val91 (A), Gly93 (A),	Pro141 (A), Phe190 (A), Asp273 (A), Asp90 (A), Phe146 (A), Glu92 (A)

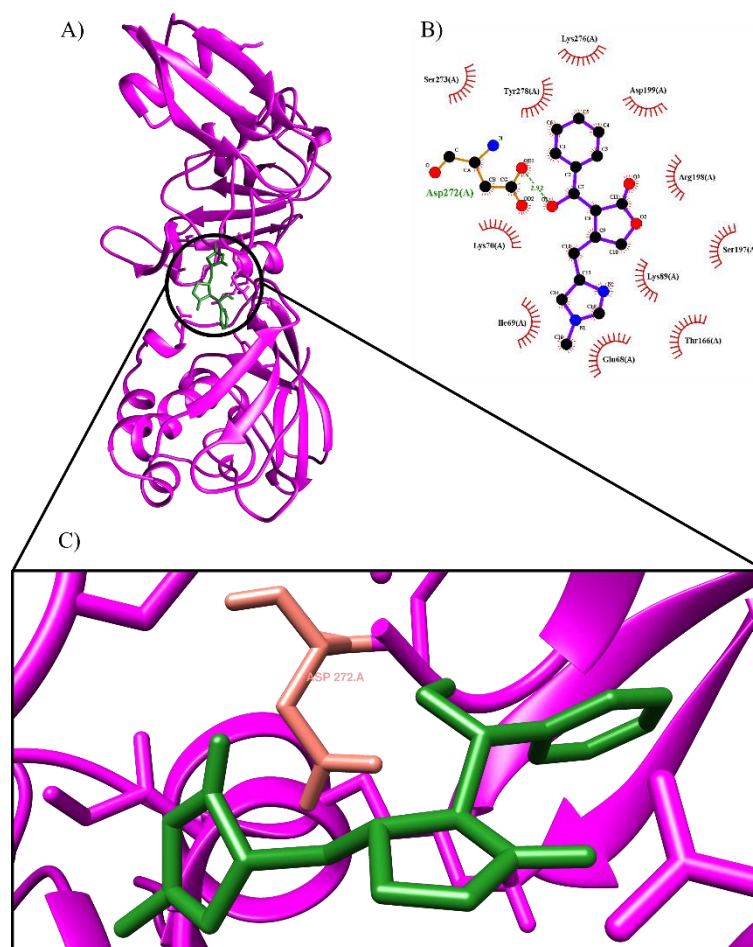
^a Energia na melhor conformação; ^b Obtidos com o programa Ligplot- software.

Fonte: Próprio autor, 2022.

Os parâmetros ótimos de afinidade molecular foram obtidos a partir da interação entre o ligante epiisopiloturina com a proteína 2H85, mas também houve afinidade molecular com as proteínas 7K7P, 2H85 e 7MC5. A melhor afinidade foi observada com energia de ligação igual a -7.2 kcal.mol⁻¹ (Tabela 9; Figura 4). A proteína nsp 14 (2H85), desempenha função de revisão do RNA viral durante a síntese e participa também do processo de evasão do sistema

imune do hospedeiro, sugerindo assim, que a EPIL pode inibir fortemente esta capacidade, tornando-se um bom composto para o desenvolvimento de fármacos (NICHOLAS *et al.*, 2022).

Figura 6-Docagem molecular 3D do complexo proteína-ligante com a proteína 2H85 e o ligante epiisopiloturina ilustrando o sitio de ligação ativo (A) com as respectivas interações ponte de hidrogênio (B e C).



Fonte: Próprio autor, 2022.

6.CONCLUSÃO

Com base na análise dos resultados, os alcaloides pilocarpina, epiisopilosina e epiisopiloturina possuem boas propriedades farmacológicas, favorecendo suas aplicabilidades no desenvolvimento de novos fármacos. Indicando assim, que ao entrarem em contato com o organismo, podem agir de maneira positiva sem causar danos significativos. Sobre as características de farmacodinâmica antiviral, as três moléculas demonstram ter capacidade de impedir a atividade viral, sobre algumas proteínas virais.

Os resultados de docagem molecular também foram significativos, pois os três compostos obtiveram boas energias mínimas de interações com as proteínas não estruturais testadas. A interação entre epiisopilosina e 6YYT (nsp12) foi a que se destacou, apresentando melhor resultado de menor energia mínima de ligação. Designando assim, que estes compostos têm elevada capacidade de inibir a ação das proteínas e induzir a morte do SARS-CoV-2 por meio do bloqueio de replicação e transcrição do vírus, sendo necessário mais estudos específicos em testes prévios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Dae-Gyun et al. Caracterização bioquímica de uma polimerase de RNA dependente de RNA do coronavírus SARS recombinante nsp12 capaz de copiar modelos de RNA viral. **Arquivos de virologia**, v. 157, n. 11, pág. 2095-2104, 2012.
- AMAZONAS, F.L., FIGUEIREDO G.F.E. Uma revisão sobre o uso das plantas medicinais como tratamento da COVID-19 e a importância do profissional farmacêutico no estado do Amazonas. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, e406101523451, 2021. (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23451>.
- AMATO, Marcelo BP et al. Ventilação mecânica na lesão pulmonar aguda (LPA)/Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, p. 119-127, 2007.
- ARAÚJO, Ana Patrícia Loureiro Machado Gomes de. **O papel da glicoproteína-P nas interações fármaco-fármaco**. 2015. Tese de Doutorado. [sn].
- BACK, Mênia Brandenburg. Levantamento de dados sobre a dispensação de fitoterápicos durante a pandemia do Covid-19 na região de abrangência da 13ª Coordenadoria Regional de Saúde. 2020.
- BARON, Rebecca M.; LEVY, Bruce D. Recent advances in understanding and treating ARDS. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- BASTOS, Ruan Sousa et al. Prospecção de Proteínas do Novo Coronavírus Covid-2019 e Potencial da Bioinformática na Busca de Novas Drogas Promissoras. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 2 COVID-19, p. 347-347, 2020.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic. Acids. Res.* 2000, 28, 235–242.
- CAIXETA, FABIANA RAQUEL; LOPES, ISABEL CRISTINA REZENDE. BIOMARCADORES NA COVID-19: REVISÃO NARRATIVA. 2022.
- CERIBELLI, Ângela et al. Recomendações para infecção por coronavírus em doenças reumáticas tratadas com terapia biológica. **Journal of autoimmunity**, v. 109, p. 102442, 2020.
- CNCFlora. *Pilocarpus jaborandi* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Pilocarpus_jaborandi>. Acesso em 6 novembro 2021.
- COELHO, Alana da Conceição Brito et al. Análise dos metabólitos secundários da mangifera indica linneaus como possibilidade de tratamento alternativo para a síndrome pós covid-19. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 10, p. 95673-95692, 2021.
- COLLINS, J. B.; VON R. SCHLEYER, P.; BINKLEY, J. S.; POPLE, J. A. Self-consistent molecular orbital methods. XVII. Geometries and binding energies of second-row molecules. A comparison of three basis sets. *The Journal of Chemical Physics*, v. 64, n. 12, p. 5142– 5151, 1976.

COUTINHO, Marcela AS; MUZITANO, Michele F.; COSTA, Sônia S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DE ALMEIDA, J. O. et al. COVID-19: Fisiopatologia e alvos para intervenção terapêutica. **Rev. Virtual Quim. ISSN**, v. 12, n. 6, p. 1464-1497, 2020.

DE ARAUJO SOUSA, Paulo Sérgio et al. Prospecção científica e tecnológica de *Pilocarpus microphyllus* e do alcaloide epiisopiloturina com ênfase na atividade antileishmania. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e59810716984-e59810716984, 2021.

DE ARAUJO SOUSA, Paulo Sergio. **Avaliação do potencial antimicrobiano de nanopartículas poliméricas de goma do cajueiro carboximetilada para incorporação da Epiisopiloturina: estudo in silico e in vitro**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Universidade Federal do Piauí – UFPI. Parnaíba-PI), p 126. 2021.

DE CARVALHO, Lucas Rodrigues et al. Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 278-285, 2018.

DE LIMA, L.I. Desenvolvimento de uma nanoformulação autoemulsificante contendo o alcaloide epiisopiloturina para melhorar sua biodisponibilidade plasmática após administração via oral/ Luiza Ianny de Lima; Orientador João Paulo Figueiró Longo./ Brasília, 2016. 61p.

FERREIRA, Leonardo LG; ANDRICOPULO, Adriano D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avançados**, v. 34, p. 7-27, 2020.

FERREIRA, Roberta Costa Santos; RIFFEL, Alessandro; SANT'ANA, Antônio Euzébio Goulart. HIV: mecanismo de replicação farmacológica, alvos de produtos de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1743-1755, 2010.

FONSECA, Aventino Humberto. Isolamento biomonitorado de alcaloides bisbenzilisquinolínicos de *Cissampelos sympodialis* com atividade antiviral. 2019.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; ... FOX, D. J. Gaussian 09w (7.0). Gaussian Inc., 2009.

GAGGAR, A., JACKSON, PL, NOERAGER, BD, O'REILLY, PJ, MCQUAID, DB, ROWE, SM, ... & BLALOCK, JE (2008). Uma nova cascata proteolítica gera um quimioatraente derivado da matriz extracelular na inflamação neutrofílica crônica. *The Journal of Immunology*, 180 (8), 5662-5669.

GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electro- negativity da rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*. 1980, 36, 3219-3228.

GAO, Yan et al. Estrutura da RNA polimerase dependente de RNA do vírus COVID-19. **Ciência**, v. 368, n. 6492, pág. 779-782, 2020.

GEORAS, Steve N.; REZAEI, Fariba. Função de barreira epitelial: na linha de frente da imunologia da asma e da inflamação alérgica das vias aéreas. **Jornal de alergia e imunologia clínica**, v. 134, n. 3, pág. 509-520, 2014.

GOODSELL, D. S.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J. Automated docking of flexible ligands: applications of autodock. *J. Mol. Recognit.* 1996, 9, 1-5.

GOODSELL, D. S. Computational docking of biomolecular complexes with Auto-Dock, in: E.A. Golemis, P.D. Adams (Eds.), *Protein-protein Interact. A Mol. Cloning Man*, Second, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2005.

GUIMARAES, Maria A. et al. Anthelmintic activity in vivo of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003656, 2015.

GUIMARÃES, Maria A. et al. O alcaloide da epiisopilosina tem atividade contra *Schistosoma mansoni* em camundongos sem toxicidade aguda. **PLoS One**, v. 13, n. 5, pág. e0196667, 2018.

GUTTENBERG, Marissa A.; VOSE, Aaron T.; TIGHE, Robert M. Role of Innate Immune System in Environmental Lung Diseases. **Current allergy and asthma reports**, v. 21, n. 5, p. 1-11, 2021.

HEADLAND, Sarah E.; NORLING, Lucy V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2015. p. 149-160.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: UFSC (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. Florianópolis, 2002. cap. 29, p.641-656.

HILLEN, H.S., KOKIC, G., FARNUNG, L. et al. Estrutura de replicação da polimerase SARS-CoV-2. **Natureza** **584**, 154-156 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2368-8>

HILL M., TACHEDJIAN G., MAK J. A embalagem e a maturação das proteínas HIV-1 Pol. *Curr HIV Res.* 2005 Jan;3(1):73-85. doi: 10.2174/1570162052772942. 15638725.

JIN, Zhenming et al. Structure of M pro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. **Nature**, v. 582, n. 7811, p. 289-293, 2020.

JUSTO, Oselys Rodriguez et al. Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Química Nova**, v. 31, p. 1699-1705, 2008.

LAM, Tommy Tsan-Yuk et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 282-285, 2020.

LEONARD, EJ, & YOSHIMURA, T. (1990). Atração de neutrófilos/proteína-1 de ativação (NAP-1 [interleucina-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2 (6), 479-486.

LIMA, David Fernandes et al. Prospecção tecnológica do jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*): espécie economicamente importante no norte e nordeste do Brasil. **REVISTA GEINTEC-GESTAO INOVACAO E TECNOLOGIAS**, v. 5, n. 1, p. 1626-1638, 2015.

LIMA, Raquel Curtinhas de et al. **Atividade antiviral de extrato de produtos naturais em modelos de infecção in vitro pelos arbovírus dengue e chikungunya**. 2020. Tese de Doutorado.

LIU, Xiaofan et al. Risk factors associated with disease severity and length of hospital stay in COVID-19 patients. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e95-e97, 2020.

LOUREIRO, Camila Melo Coelho et al. Alterações pulmonares na COVID-19. **Revista Científica Hospital Santa Izabel**, v. 4, n. 2, p. 89-99, 2020.

MASTERS, Paul S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in virus research**, v. 66, p. 193-292, 2006.

MATTIUZZI, Camilla; LIPPI, Giuseppe. Which lessons shall we learn from the 2019 novel coronavirus outbreak? **Annals of translational medicine**, v. 8, n. 3, 2020.

MELO, Cybelly Marques de. **Caracterização físico-química do protótipo epiisopiloturina e incremento do seu perfil de dissolução através da obtenção de complexos de inclusão**. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

MELO, H. M.; PAIVA, M. J. M.; CARVALHO, C. J. S. Pandemia do SARS-COV-2: uma revisão integrativa sobre os principais medicamentos, aprovados ou em fase de estudos, que podem ser utilizados no tratamento da COVID-19. **Pubsaúde**, v. 6, p. a151, 2021.

MENDONÇA, Vanessa Amaral et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343-350, 2008.

MIURA, L. M. C. V. Isolamento do alcaloide epiisopiloturina a partir da biomassa do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga. **Trabalho de conclusão de curso (Mestrado)– Faculdade de Biologia, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba**, p. 126, 2009.

MONTANARI, Carlos Alberto; BOLZANI, Vanderlan da S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MORAIS, Victor Nepomuceno et al. Doença pelo coronavírus 2019: Uma revisão sistemática. **Desafios-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2021.

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 1998, 19, 1639-1662.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; OLSON, A. J. Using AutoDock for ligand-receptor docking, in: *Curr. Protoc. Bioinforma.*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, 2008.

N.H.M., K.S., € O.D., C.B., R.E.A., and H.A. designed research; N.H.M., K.S., € O.D., C.B., S.B., L.Y., C.D., R.E.A., and H.A. performed research; N.H.M., K.S., € O.D., C.B., S.B., L.Y., C.D., R.E.A., and H.A. analyzed data; and N.H.M., K.S., € O.D., R.E.A., and H.A. wrote the paper. Estrutura e dinâmica do SARS-CoV-2 revisando exorbitante exoN. PNAS 2022 Vol. 119 No. 9 e2106379119.

O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: melhorando a velocidade e precisão do encaixe com nova função de pontuação, otimização eficiente e multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461. DOI 10.1002/jcc.21334. Consulte: <http://vina.scripps.edu> for para obter mais informações.

PEREIRA, Rafael et al. Antifungal activity, antibiofilm, synergism and molecular docking of *Allium sativum* essential oil against clinical isolates of *C. albicans*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e313101220457-e313101220457, 2021.

PIRES, Douglas EV; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of medicinal chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.

ROCHA, Jefferson A. et al. Computational quantum chemistry, molecular docking, and ADMET predictions of imidazole alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* with schistosomicidal properties. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198476, 2018.

ROCHA, T.M. Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de alcaloides imidazólicos de *Pilocarpus microphyllus*: estudo in vitro, in vivo e in silico. 2017, p. 96. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SANNER, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* 1999, 17, 57-61.

SANTOS, Ana Paula; MORENO, Paulo Roberto Hrihorowitsch. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 40, p. 116-137, 2004.

SCHERER, Philip M.; CHEN, Delphine L. Imaging pulmonary inflammation. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 11, p. 1764-1770, 2016.

SILVA, Fernanda Geny Calheiros et al. Alimentos, Nutracêuticos e Plantas Medicinais Utilizados como Prática Complementar no Enfrentamento dos Sintomas do Coronavírus (Covid-19): Uma Revisão. 2020.

SILVA, Valdelânia G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 6, p. 1071-1077, 2013.

SINGHAL, Tanu. A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). **The indian journal of pediatrics**, v. 87, n. 4, p. 281-286, 2020.

SOLIS, F. J.; WETS, R. J. B. Minimization by Random Search Techniques. *Math. Oper. Res.* 1981, 6, 19-30.

SOUSA, P. S. A. Avaliação do Potencial Antimicrobiano de Nanopartículas Poliméricas de Goma do Cajueiro Carboximetilada para Incorporação da Epiisopiloturina: Estudo in silico e in vitro. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia pela Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022).

STEFANO R., MARIE-PIERRE E., RACHEL U., BRUNO C., DIDIER N., VALERIE C., CHRISTIAN C., JOHN Z., e BRUNO C. Estrutura cristalina e determinantes mecanicistas da proteína não estrutural sars coronavirus 15 definem uma família endoribonuclease. *PNAS*, **August 8, 2006**, vol. 103, no. 32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601708103>

STRATMANN, R. E.; BURANT, J. C.; SCUSERIA, G. E.; FRISCH, M. J. Improving harmonic vibrational frequencies calculations in density functional theory. *The Journal of Chemical Physics*, v. 106, n. 24, p. 10175–10183, 1997.

SUBISSI, Lorenzo et al. Um complexo de proteína de coronavírus de síndrome respiratória aguda grave integra atividades de RNA polimerase e exonuclease processivas. **Anais da Academia Nacional de Ciências**, v. 111, n. 37, pág. E3900-E3909, 2014.

VERAS, Leiz Maria Costa. **Caracterização e Aplicações Biotecnológicas de Alcaloides Isolados do Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. Tese (Doutorado em Biotecnologia- Universidade Federal do Piauí – UFPI. Parnaíba-PI), p. 117. 2014. ¹¹⁸⁹²⁻¹¹⁸⁹⁷,

VERAS, L. M.; GUIMARAES, M. A.; CAMPELO, Y. D.; VIEIRA, M. M.; NASCIMENTO, C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L.; NAKANO, E.; KUCKELHAUS, S. S.; BATISTA, M. C.; LEITE, J. R.; MORAES, J. Activity of epiisopiloturine against *Schistosoma mansoni*. *Curr Med Chem.*, v. 19, n. 13, p. 2051-2058, 2012.

VOLTARELLI, Júlio C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, 1994.

WAY2DRUG. Disponível em: <<http://www.way2drug.com/index.php>>. Acesso em: 11 de novembro de 2020.

WERNECK, Guilherme Loureiro; CARVALHO, Marília Sá. A pandemia de COVID-19 no Brasil: crônica de uma crise sanitária anunciada. 2020.

WILLIAMS, Andrew E.; CHAMBERS, Rachel C. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 306, n. 3, p. L217-L230, 2014.

WU, Chaomin et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. **JAMA internal medicine**, v. 180, n. 7, p. 934-943, 2020.