

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

NÁGILA CAROLINE FIALHO SOUSA

**POTENCIAL MODULADOR DOS METABÓLITOS DA SEMENTE E POLPA
DE *Euterpe oleracea* Mart. SOBRE A VIA Orai1/STIM1/NFAT DE LINFÓCITOS
T: UMA ABORDAGEM *in silico***

SÃO LUÍS – MA

2023

NÁGILA CAROLINE FIALHO SOUSA

**POTENCIAL MODULADOR DOS METABÓLITOS DA SEMENTE E POLPA
DE *Euterpe oleracea* Mart. SOBRE A VIA Orai1/STIM1/NFAT DE LINFÓCITOS
T: UMA ABORDAGEM *in silico***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro
Pereira

SÃO LUÍS – MA

2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

FIALHO SOUSA, NAGILA CAROLINE.

POTENCIAL MODULADOR DOS METABÓLITOS DA SEMENTE E POLPA DE Euterpe oleracea Mart. SOBRE A VIA Orai1/STIM1/NFAT DE LINFÓCITOS T: UMA ABORDAGEM in silico / NAGILA CAROLINE FIALHO SOUSA. - 2023.
78 p.

Orientador(a): PAULO VITOR SOEIRO PEREIRA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUIS, 2023.

1. AÇAÍ. 2. CANAL DE CÁLCIO. 3. IMUNOMODULAÇÃO. 4. PRODUTOS NATURAIS. I. SOEIRO PEREIRA, PAULO VITOR. II. Título.

Dedico esta dissertação a minha amada mãe, Maria Aparecida, que sempre incentivou e priorizou meus estudos e a busca por novas realizações profissionais.

Ao meu pai, José Martins (in memoriam), minha inspiração para seguir com toda dedicação à pesquisa científica.

Ao meu filho, José Rafael, ainda tão pequenino na barriga, por aumentar meu incentivo e determinação.

Ao meu marido, Bruno Nojosa, pelo incentivo, amor e carinho durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Durante esses anos de mestrado, gostaria de agradecer a algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para a realização de mais este sonho. Por isso, expresso aqui, através de palavras sinceras, a importância que elas tiveram nesta conquista e a minha gratidão a todas elas.

Primeiramente à Deus, pelo dom da vida, por ter me dado sabedoria, força e capacidade para concluir mais essa etapa da pesquisa, além de ter me guardado e ter me dado forças nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro, meu orientador, pelos ensinamentos, parceria e profissional que é. Obrigada por tornar a caminhada mais leve, por sua dedicação, que o fez, por muitas vezes deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar a orientar. E, principalmente, obrigada por aceitar minha orientação sem me conhecer, também por sempre ter acreditado e colocado a confiança em mim ao longo desses anos. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, não somente nesse trabalho, mas em todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

A minha família, pela compreensão ao serem privados em muitos momentos da minha companhia e atenção, e pelo profundo apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis. Obrigada por sempre desejarem o melhor para mim, pelo esforço para superar os obstáculos em meu caminho e chegar até aqui, e principalmente pelo amor que vocês têm por mim. Sou eternamente grata pelo que sou, por tudo que consegui conquistar, em especial minha mãe, meu irmão Talles José e meu esposo.

As professoras Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva e Profa. Dra. Dayanne Silva Freitas pela colaboração na execução inicial que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos professores do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, em especial a Profa. Dra. Rachel Melo Ribeiro por todo o conhecimento repassado na execução da disciplina de Seminários de Pesquisa II.

Aos queridos colegas de laboratório do LPI Nayna Sabrina, Kelly Portela, Eder Fialho, Caroline Martins, Douglas, dona Sônia por toda contribuição e parceria neste trabalho.

Ao laboratório de química e produtos naturais (LQPN) da UFMA e a Profa. Dra. Cláudia Quintino da Rocha, por todo o suporte na preparação, bioprospecção e química dos extratos vegetais.

A minha turma de mestrado, que mesmo remotamente na maioria das vezes, conseguimos manter parceria e esclarecimento acerca das dúvidas mais importantes em nosso grupo de WhatsApp.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e incentivaram nessa caminhada sem fim que é a busca por conhecimento.

NÁGILA CAROLINE FIALHO SOUSA

**POTENCIAL MODULADOR DOS METABÓLITOS DA SEMENTE E POLPA DE
Euterpe oleracea Mart. SOBRE A VIA Orai1/STIM1/NFAT DE LINFÓCITOS T:
UMA ABORDAGEM *in silico***

Dissertação aprovada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro
Universidade Federal do Maranhão
(Orientador)

Prof. Dr. Lucas Martins França
Universidade Federal do Maranhão
(Membro titular)

Profa. Dra. Rachel Melo Ribeiro
Universidade Federal do Maranhão
(Membro interno ao programa)

Profa. Dra. Débora Luana Ribeiro Pessoa
Universidade Federal do Maranhão
(Membro externo ao programa)

RESUMO

A espécie *Euterpe oleracea* Mart, conhecida como açaí e nativa da região amazônica, é valorizada por suas propriedades nutritivas e benefícios à saúde, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. No entanto, ainda não é sabido todo potencial biológico dos seus metabólitos mais especificamente sobre o sistema imunológico. Neste contexto, o presente trabalho objetivou a avaliação *in silico* de compostos majoritários do extrato de semente e polpa de açaí na via Orai1/STIM1/NFAT de ativação dos linfócitos T. Foram selecionados os compostos procianidina C1 (PCC1), Epigallocatequina-3,3-di-O-Galato (EGCdiG), patulitrina (PAT) e cianidina (CY) para análise computacional. As estruturas dos compostos foram obtidas do PubChem e utilizadas para avaliação das características físico-químicas, previsão de espectros de atividade biológica, dados toxicológicos, biodisponibilidade oral teórica, perfil de interação dos compostos com alvos farmacológicos, e interação com as proteínas da via de interesse através de docagem molecular. Todos os compostos avaliados apresentaram propriedades físico-químicas relevantes, mostrando-se promissores por alguma via de administração na análise de biodisponibilidade radar, com destaque para CY e a PAT com as melhores biodisponibilidades orais. De acordo com os parâmetros farmacocinéticos esses dois compostos mostraram potencial para absorção no trato gastrointestinal e pele. As previsões PASS (Previsão de espectros de atividade para substâncias) revelaram que todos os compostos têm potencial para várias atividades, incluindo inibição da peroxidase, eliminação de radicais livres, efeitos antioxidantes e regulação da resposta imunoinflamatória. Ainda, CY e PAT exibiram baixa capacidade de hepatotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade. A análise de docking molecular demonstrou que CY (-7,0 kcal/mol) e PAT (-8,3 kcal/mol) se ligam ao sítio regulador Orai1 (Ala282 e Phe171, respectivamente), enquanto EGCdiG (-7,0 kcal/mol) e CY (-6,0 kcal/mol) exibiram afinidade pelo sítio de ativação/regulação do STIM1 (Gly22 e Asp32, respectivamente). Esses resultados demonstram que fitoquímicos de *E. oleracea*, principalmente a CY e a PAT, apresentam potencial como moduladores da atividade de linfócitos T, devido à sua interação com as proteínas da via Orai1/STIM1/NFAT, contribuindo para validação científica do seu uso como de futuros agentes imunomoduladores.

Palavras-chave: Produtos naturais; Açaí; Canal de cálcio; Imunomodulação.

ABSTRACT

The species *Euterpe oleracea* Mart, known as açai and native to the Amazon region, is valued for its nutritional properties and health benefits, including antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activities. However, the full potential action of the secondary metabolites of this plant species on the immune system is not yet known. In this context, the present work aimed at the in silico evaluation of major compounds from açai seed extract and pulp in the Orai1/STIM1/NFAT pathway of T lymphocyte activation. The compounds procyanidin C1 (PCC1), Epigallocatechin-3,3-di-O-Gallate (EGCdiG), patulithrin (PAT) and cyanidin (CY) were selected for computational analysis. The structures of the compounds were obtained from PubChem and used to evaluate the physicochemical characteristics, prediction of biological activity spectra, toxicological data, theoretical oral bioavailability, interaction profile of compounds with pharmacological targets, and interaction with proteins of the pathway of interest through molecular docking. All compounds evaluated showed relevant physicochemical properties, showing promise for some route of administration in the radar bioavailability analysis, with emphasis on cyanidin and patulithrin with the best oral bioavailability. According to pharmacokinetic parameters, these two compounds showed potential for absorption in the gastrointestinal tract and penetration through the skin. PASS predictions of biological activity spectra revealed that all compounds have potential for various activities, including peroxidase inhibition, free radical scavenging, antioxidant effects, and regulation of the immunoinflammatory response. Furthermore, CY and PAT exhibited low toxic potential in hepatotoxicity, cytotoxicity and mutagenicity. Molecular docking analysis demonstrated that CY (-7.0 kcal/mol) and PAT (-8.3 kcal/mol) bind to the Orai1 regulatory site (Ala282 and Phe171, respectively), while EGCdiG (-7.0 kcal/mol) and CY (-6.0 kcal/mol) exhibited affinity for the STIM1 activation/regulation site (Gly22 and Asp32, respectively). These results demonstrate that the selected compounds, mainly cyanidin and patulithrin, present characteristics that validate their future use as modulating agents of T lymphocyte activity, due to their interaction with proteins of the Orai1/STIM1/NFAT pathway.

Keywords: Natural products; Açai; Calcium channel; Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO		Página
Figura 1	Ativação da via Orai1/STIM1/NFAT no citoplasma, retículo endoplasmático e membrana celular.	23
Figura 2	Aspecto geral da palmeira e fruto de <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).	27
Quadro 1	Perfil fitoquímico dos constituintes da polpa e semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	26
Quadro 2	Propriedades farmacológicas da polpa de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	28
Quadro 3	Propriedades farmacológicas da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.	29

CAPÍTULO 1

Figura 1	Estrutura química dos compostos secundários dos extratos de semente e polpa de <i>E. oleracea</i> Mart selecionados para avaliação de seu potencial na via Orai1/STIM1/NFAT.	49
Figura 2	Análise “radar” de biodisponibilidade oral dos compostos selecionados.	55
Figura 3	A análise de docking molecular dos compostos selecionados do extrato de <i>E. oleracea</i> Mart com o canal de cálcio Orai1.	62
Figura 4	A análise de docking molecular dos compostos selecionados do extrato de <i>E. oleracea</i> Mart com a proteína STIM1.	64
Tabela 1	Propriedades físico-químicas dos compostos selecionados por análise <i>in silico</i> .	53
Tabela 2	Semelhança com drogas dos compostos selecionados por análise <i>in silico</i> .	54
Tabela 3	Parâmetros farmacocinéticos dos compostos selecionados por análise <i>in silico</i> .	56
Tabela 4	Predição de toxicidade dos compostos selecionados utilizando ProTox-II.	56
Tabela 5	Previsão <i>in silico</i> dos espectros de atividade biológica dos compostos selecionados.	57
Tabela 6	Previsão dos alvos moleculares de compostos de <i>E. oleracea</i> Mart por análise <i>in silico</i> .	59

Tabela 7	Score da docagem molecular, sítios de ligação, distâncias das pontes de hidrogênio e constantes de inibição das interações dos compostos selecionados com a proteína Orai1 da via de ativação de linfócitos T.	61
Tabela 8	Score da docagem molecular, sítios de ligação, distâncias das pontes de hidrogênio e constantes de inibição das interações dos compostos selecionados com a proteína STIM1 da via de ativação de linfócitos T.	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

STIM1	Stromal interaction molecule, em português, molécula de interação estromal
Orai1	Calcium Release-Activated Calcium Modulador 1, em português, modulador de cálcio ativado por liberação de cálcio 1
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
NFAT	Nuclear factor of activated T cells, em português, fator nuclear de células T ativadas
PCC1	Procianidina C1
EGCdiG	Epigallocatequina-3,3-di-O-galato
PAT	Patulitrina
CY	Cianidina
AÇAÍ	<i>Euterpe oleracea</i> Mart
TCR	<i>T cell receptor</i> , em português, receptor de células T
BCR	<i>B cell receptor</i> , em português, receptor de células B
APCs	Células apresentadoras de antígenos
RE	Reticulo endoplasmático
CRAC	Canais de cálcio ativado por liberação de cálcio
SOC	Canais de cálcio operado por armazenamento
SPCA2	Via secretória de transporte de Ca^{2+} ATPase-2
SERCA	Bomba de cálcio do retículo endoplasmático
RCSB	Research Collaboraty for Structural Biology, em português, colaboração de pesquisa em biologia estrutural

LBDD	Ligand based Drug Design, em português, desing de medicamentos baseado em ligantes
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship, em português, relação de atividade de estrutura quantitativa
SBDD	<i>Structure Based Drug Design</i> , em português, projeto de medicamentos baseado em estruturas
NCBI	National Istitutes of Health, National Center for Biotechnology Information
MM	Massa molecular
TPSA	<i>Topological surface área</i> , em português, área de superfície polar
NALH	Aceptores de ligação de hidrogênio
NDLH	Doadores de ligação de hidrogênio
BHE	Barreira hematoencefálica
CACO-2	Células extraídas do adenocarcinoma de colorretal humano
LD50	Valor da dose letal
PASS	Previsão de espectros de atividade para substâncias
PA	Maior probabilidade de atividade
PI	Menor probabilidade de atividade
LOG P	Coeficiente de partição
H	Hidrogênio
LIPO	Lipofilicidade
FLEX	Flexibilidade
SIZE	Peso molecular
POLAR	Polaridade

INSOLU Insolubilidade

INSATU Insaturação

TGI Trato gastrointestinal

PGP Substrato da glicoproteína P

LOG KP Penetração pela pele

CYP Cytochromes P450, em português, Citocromo P450

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1. Sistema Imunológico.....	19
2.1.1. Cálcio e a resposta imune mediada por linfócitos T.....	21
2.2. Produtos Naturais	23
2.3. <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	24
2.3.1. Aspectos botânicos e fitoquímicos.....	24
2.3.2 Atividades farmacológicas da polpa de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	27
2.3.3 Atividades farmacológicas da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	28
2.4. Análise computacional <i>in silico</i>	29
2.4.1 Softwares online de análise computacional	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos	40
CAPÍTULO I.....	41
RESUMO GRÁFICO.....	42
1 INTRODUÇÃO.....	46
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Seleção e preparação dos Ligantes.....	48
2.2 Análise das propriedades físico-químicas e de semelhança com medicamentos.....	49
2.3 Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos.....	49
2.4 Avaliação dos parâmetros toxicológicos.....	50
2.5 Predição computacional de espectros de atividade biológica.....	50
2.6 Previsão de perfis de interação com alvos farmacológicos.....	51
2.7 Seleção das Proteínas.....	51
2.8 Docagem molecular.....	51

3. RESULTADOS	53
3.1 Análise físico-química dos compostos.....	53
3.2 Estimativa da biodisponibilidade oral teórica dos compostos identificados no extrato da polpa e semente de <i>Euterpe oleracea Mart.</i>	54
3.4 Comportamento farmacocinético.....	55
3.5 Análise Toxicocinética de Compostos Naturais Seleccionados.....	56
3.6 Predição dos espectros de atividade biológica.....	57
3.7 Previsão de perfis de interação com alvos farmacológicos.....	58
3.8 Docagem molecular dos compostos seleccionados com Orai1.....	60
4.DISSCUSSÃO	65
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	76
ANEXO 1 - Artigo submetido a revista para publicação	77

1 INTRODUÇÃO

Os linfócitos T são células essenciais para o funcionamento da imunidade adaptativa, que é responsável por identificar e responder de forma específica nos mais diversos contextos, seja contra um patógeno ou à presença de uma célula tumoral (WIK et al, 2022). Esses linfócitos são importantes para a formação da memória imunológica, que permite uma resposta mais rápida e eficiente do sistema imunológico e a efetiva construção da imunidade (DONG et AL, 2021). Dessa forma, a ativação adequada dessas células é fundamental para o correto funcionamento do sistema imunológico e sua falha leva a condições de erros inatos da imunidade graves, como a imunodeficiência combinada grave (SCID) (PUCK et al, 2019).

A ativação dos linfócitos T é um processo complexo que envolve a participação de diferentes moléculas e vias de sinalização. Um dos principais mecanismos de ativação dos linfócitos T é a entrada de cálcio na célula, que é mediada pelos canais de cálcio controlados pelas proteínas Orai1 (*Calcium Release Activated Calcium Modulador 1*) e STIM1 (*Stromal interaction molecule*) (VAETH et al, 2020). Quando os linfócitos T são estimulados pelo reconhecimento de antígenos, a proteína STIM1, localizada na membrana do retículo endoplasmático, é ativada e migra para as regiões próximas aos canais de cálcio Orai1, na membrana plasmática, desencadeando a abertura desses canais e o influxo de cálcio (PRAKRIYA et al, 2015). A elevação do nível intracelular de cálcio desencadeia a ativação do fator de transcrição NFAT (*Nuclear factor of activated T cells*), que é responsável por regular a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica, como a produção de citocinas e a proliferação celular (DIERCKS et al, 2018).

Dada sua importância como mecanismo fundamental para a resposta imunológica adaptativa, a via Orai1/STIM1/NFAT de ativação dos linfócitos T tem se tornado um alvo farmacológico para regulação da função dessas células (WEIDINGER et al, 2013; VAETH et al, 2020). Nesse sentido, o estudo de produtos naturais, como *Euterpe oleracea* Mart (açai) e seus compostos, tem sido uma área promissora de pesquisa na busca por novos reguladores da resposta dos linfócitos T (MARQUES et al, 2017). Alguns estudos têm mostrado que os compostos presentes no açai podem modular a atividade dos linfócitos T, levando a uma redução da inflamação deletéria e um aumento da resposta imunológica benigna (FORD et al, 2016; DORNELES et al, 2021; PERINI et AL, 2023).

O açai é rico em compostos fenólicos, com destaque para as antocianinas, que conferem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (FERNANDES et al, 2021). Em relação aos compostos majoritários obtidos do extrato do açai, estudos descrevem que a

procianidina C1 possui propriedades antiproliferativas, pois pode induzir apoptose em células de câncer de mama, também o uso dessas moléculas é crescente no tratamento de doenças, como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, pois são capazes de prevenir danos celulares possivelmente relacionados ao estresse oxidativo (VERSTRAETEN et al, 2003; VILLALAÍN et al, 2022). A epigalocatequina-3-galato (EGCdiG), é uma substância polifenólica com efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antioxidantes (SUN et al, 2022). As antocianinas com destaque para o fitoquímico cianidina possui atividades anti-inflamatória, anti-apoptótica e antioxidante (BAI et al, 2022). A patulitrina se mostra com grande potencial em reduzir a inflamação, assim como sua atividade antioxidante *in vitro* (YASUKAWA et al, 2013). Com isso, novos estudos precisam ser desenvolvidos para elucidar melhor os mecanismos e suas atividades.

Estudos estão sendo desenvolvidos para elucidar suas propriedades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória e antioxidante, como os que demonstram que o extrato das sementes de açaí exibe capacidade antioxidante devido ao conteúdo de procianidinas oligoméricas, ácido protocatecoico, ácido di-hidroxibenzoico fenólico e epicatequina (ODENDAAL et al., 2014). Todos esses compostos apresentam potencial para modulação da resposta imunológica, baseada nas funções efetoras de linfócitos T, no entanto o processo de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos fármacos é longo, custoso e incerto.

Nos últimos anos, a utilização de métodos computacionais reduziu os custos e tempo nas primeiras fases do processo de P&D, permitindo a análise de características importantes e a seleção de compostos promissores logo no início do processo (ZANG et al, 2022). Dessa forma, os estudos computacionais evitam o desperdício de recursos em compostos menos promissores e levam à minimização da necessidade de testes em animais e humanos, reduzindo o uso de recursos e possíveis riscos éticos (LIANG et al, 2019). Nesse sentido, o presente trabalho testou, através de estratégias *in silico*, a hipótese de que quatro (procianidina C1, Epigalocatequina-3,3-di-O-Galato, patulitrina (PAT) e cianidina) dos compostos majoritários dos extratos de semente e polpa de *Euterpe oleracea* Mart interagem com as proteínas da via Orai1/STIM1/NFAT de ativação dos linfócitos T. Estes resultados direcionarão estudos experimentais *in vitro* para confirmação do potencial desses compostos no desenvolvimento de terapias alternativas para doenças inflamatórias e autoimunes, além de fornecer novas perspectivas para o uso de produtos naturais como fonte de compostos bioativos com potencial terapêutico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistema Imunológico

O sistema imunológico tem por função principal proteger o organismo contra agentes infecciosos ou situações que possam desencadear alterações morfofuncionais indesejáveis, então apresenta-se como imunidade inata e imunidade adaptativa. É responsável por respostas imunológicas imediatas através de barreiras que podem ser químicas, físicas e biológicas que são produzidas por moléculas e células especializadas. Por outro lado, o sistema imune adquirido apresenta maior complexidade, pois envolve também os linfócitos T e B que atuam de modo a desenvolver respostas imunológicas específicas a um determinado patógeno, mas que precisam de estímulos para ativação após entrar em contato com o agente infeccioso (AQUINO, 2021).

O envolvimento dos linfócitos por meio do receptor de células T (TCR) com células apresentadoras de antígenos (APCs), a partir da sua elevação dos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Quando os níveis aumentam os linfócitos param de crescer e formam sinapses imunológicas estáveis. Além de suas funções com longa duração, incluem expressão de genes, proliferação celular, produção de citocinas e diferenciação de linfócitos. Recentemente foram compreendidos os mecanismos reguladores da sinalização de cálcio em linfócitos (PARK et al, 2020). Então o influxo se torna necessário devido a função de longa duração quando acontece a concentração de Ca^{2+} , pois ainda se mantém com os níveis basais elevados por várias horas.

Diversos mecanismos participam durante a resposta adaptativa na ativação dos linfócitos T, no entanto, precisam de moléculas e proteínas para sua ativação, como os agrupamentos STIM1 e Orai1. A proteína STIM1 é encontrada no retículo endoplasmático (RE), também é a principal proteína envolvida no agrupamento e ativação de Orai1 (QIU et al 2019). A família de STIMs são proteínas de transmembrana, localizada no lúmen do RE, ainda os domínios de interação proteica do STIM são encontrados no lúmen e no citoplasma do RE, enquanto a ligação do Ca^{2+} é realizado na porção do STIM1 voltado para o lúmen do RE (ZHANG et al, 2022).

Ainda, as mutações dos resíduos de glutamato e aspartato de ligação de cálcio ativam os canais SOC (Canais de cálcio operado por armazenamento) e CRAC (Canais de cálcio ativado por liberação de cálcio) independente dos níveis de Ca^{2+} . Por isso, as proteínas

STIM servem como sensores dos níveis de Ca^{2+} no RE. Quando acontece a redução dos níveis de Ca^{2+} no lúmen do RE, é ativada a via da molécula STIM, permitindo a entrada de Ca^{2+} , via membrana celular, através dos canais Oraís (ZHANG et al, 2022).

A proteína Orai1 de membrana forma os canais de cálcio (PRAKRIYA et al, 2015; BUTORAC et al, 2019). A entrada de cálcio, através dos canais Orai1 depende da ativação e regulação por STIM1, e leva à ativação da calcineurina, uma proteína fosfatase serina/treonina dependente de cálcio e calmodulina que por sua vez regula a expressão gênica através da ativação de fatores de transcrição, como NFAT (fator nuclear de células T ativadas) (DIERCKS et al, 2018; PARK et al, 2020).

Os canais Orai1 são divididos em três famílias, como Orai1, Orai2 e Orai3, estes canais Orai1 contém proteínas da membrana celular capazes de liberar Ca^{2+} ativado no citoplasma celular (RAFFAELLO et al, 2016). A proteína Orai1 de membrana forma os canais de Ca^{2+} (PRAKRIYA et al, 2015; BUTORAC et al, 2019). A entrada de cálcio, através dos canais Orai1 depende da ativação e regulação por STIM1, e leva à ativação da calcineurina, uma proteína fosfatase serina/treonina dependente de cálcio e calmodulina que por sua vez regula a expressão gênica através da ativação de fatores de transcrição, como NFAT (fator nuclear de células T ativadas) (DIERCKS et al, 2018; PARK et al, 2020). Este complexo calmodulina-calcineurina é capaz de desfosforilar NFAT, levando à migração deste para o núcleo, conduzindo à transcrição gênica envolvida na proliferação e morte celular. (PARK et al, 2020).

2.1.1 Cálcio e a resposta imune mediada por linfócitos T

O Ca^{2+} intracelular é importante no processo de construção da imunidade celular, como também suas concentrações aumentadas estão relacionadas na regulação a nível citosólico em células, como os linfócitos. Também estão envolvidos no controle de funções complexas e efetoras, como a proliferação, metabolismo, secreção de anticorpos, citocinas e na sua citotoxicidade. Por outro lado, quando é alterada essa regulação de Ca^{2+} nos linfócitos pode levar a diversas síndromes autoimunes, inflamatórias e imunodeficiências, como exemplo, a imunodeficiência combinada grave (SCID) (PUCK et al, 2019; TREBAK et al, 2019).

Vários estudos mostram que estão envolvidos na função de linfócitos T, assim como na homeostase por meio de canais e bombas de Ca^{2+} , Na^+ e K^+ realizando controle indiretamente através do potencial de membrana celular (TREBAK et al, 2019). O canal de

Ca^{2+} é ativado por CRAC (PRAKRIYA et al, 2015), como função do canal é a identificação de STIM e de Orai1, que são dois reguladores essenciais do canal CRAC (OH-HORA et al, 2009). Ainda, estão presentes na maioria das células do sistema imunológico, no entanto foram identificados pela primeira vez em mastócitos leucêmicos humano e células T Jurkat (LEWIS, 1989; ZWEIFACH, 1993; HOTH, 1996).

São canais seletivos para Ca^{2+} em comparação com outros tipos de cátions, que também são considerados como canal prototípico para entrada de Ca^{2+} , podendo ser operado por armazenamento (SOC). A depleção dos estoques de Ca^{2+} no RE resulta da ligação do antígeno a imunorreceptores, incluindo o TCR e BCR (*B cell receptor*, em português, receptor de células B), os receptores como $\text{Fc}\gamma$ e $\text{Fc}\epsilon$, receptores de quimiocinas acoplados à proteína G e outros receptores de reconhecimento.

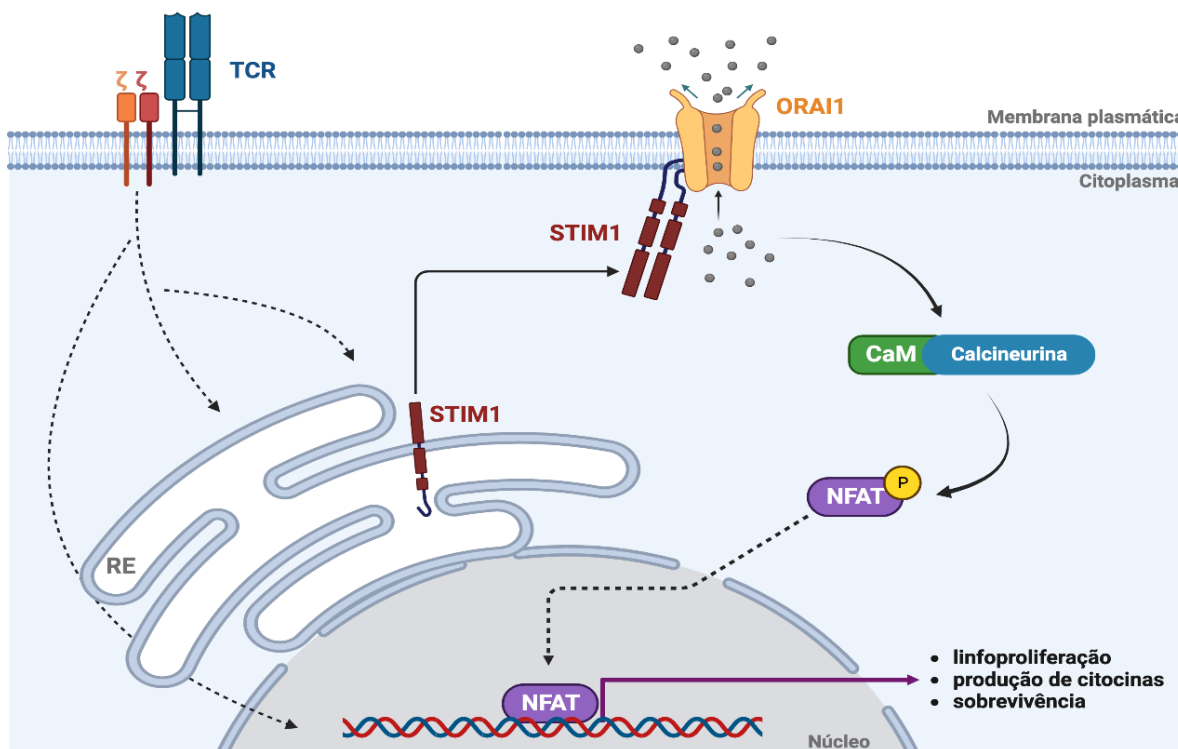


Figura 1. Ativação da via Orail/STIM1/NFAT no citoplasma, retículo endoplasmático e membrana celular. (Fonte: autor). O Ca^{2+} é armazenado em diferentes organelas, incluindo o Retículo endoplasmático (RE). Quando há redução de Ca^{2+} no RE, existe um sensor o STMI1 que oligomeriza e se comunica com o canal de Orail. Este Orail vai possibilitar a entrada de Ca^{2+} para o citoplasma. A elevação sustentada de Ca^{2+} mediada por Orail ativa a desfosforilação de NFAT através da calcineurina no citoplasma realizando a sua migração para o núcleo, favorecendo a ativação dos linfócitos.

2.2 Produtos Naturais

A descoberta de produtos naturais bioativos de plantas contribui para a obtenção de novos fármacos. Os produtos naturais são considerados alternativos, devido à diversidade em suas propriedades localizadas em sua estrutura e os mecanismos de ação biológica (SIMONETTI et al, 2019). A transformação de um produto natural em medicamento deve ser feita preservando suas características químicas e farmacológicas, para garantir sua ação biológica, segurança de utilização e valorização do potencial terapêutico (EKIERT et al, 2020). O Brasil possui um extenso bioma vegetal com diversas plantas utilizadas em diversos tratamentos de doenças pela população (MARTINS et al, 2022). Apesar do potencial, o conhecimento sobre o perfil químico e biológico ainda é limitado em diversas plantas medicinais. É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (ALVES et al, 2022).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (CERVELLATTI et al, 2021). As práticas integrativas e complementares em saúde gradativamente se tornaram uma realidade na saúde pública brasileira. A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares instituiu a fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS), que incentiva e compreende como recurso terapêutico pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas (DE ALMEIDA, 2019; ROCHA, 2022).

A prática no uso da Fitoterapia para fins terapêuticos através da política aprovada por meio do “Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que tem o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, promover a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e desenvolver a indústria nacional” que priorizam o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, assim como o uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006). Segundo o Ministério da Saúde, o serviço de Fitoterapia é ofertado em 1.108 municípios, segundo dados de 2017 do SISAB – Sistema de Informação em Saúde para a Atenção Básica no Brasil (BRASIL, 2020).

Destaca-se o açaí como promissor em seus estudos e no setor da agroindústria como fonte de extração de palmito e utilização de frutos na região amazônica, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Maranhão e Amapá (LAURINDO et al, 2023). O estudo de revisão sistemática, foi identificado flavonoides presentes no açaí com potencial para o tratamento de doenças como o Alzheimer e Parkinson, e são candidatos a medicamentos em

pesquisas clínicas futuras (DE OLIVEIRA et al., 2019). O Brasil é o maior produtor, além de consumidor e exportador de açaí, o Maranhão possui grande potencial extrativista vegetal, sendo posicionado em terceiro lugar pela coleta extrativista estadual a nível nacional (BRASIL, 2020).

2.3 *Euterpe Oleracea* Mart

2.3.1. Aspectos botânicos e fitoquímicos

Euterpe Oleracea Mart é uma das espécies mais conhecidas no mundo, popularmente chamada açaí, uma palmeira pertencente à família Arecaceae, considerada de importância econômica, social e cultural da região Norte do Brasil, na Amazônia, a família está representada por 39 espécies (OLIVEIRA et al, 2019). A palmeira é multicauleada com troncos que alcançam altura de 3 a 20 metros, seus frutos possuem grande aplicação comercial devido ao alto valor nutritivo e propriedades antioxidantes, sendo, por isso, considerado um "super fruto", o consumo do açaí se dá ao longo de todo o Brasil, além do seu uso popular para tratamento de infecções da pele, distúrbios digestivos e infecções parasitárias (LAURINDO et al, 2023).

A classificação taxonômica está ordenada na seguinte sequência hierárquica segundo CRONQUIST, 1981:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida (Monocotiledoneae)

Ordem: Arecales (Príncipes)

Família: Arecaceae (Palmae)

Subfamília: Arecoideae

Tribo: Areceae

Subtribo: Euterpeinae

Gênero: *Euterpe*

Espécie: *Euterpe oleracea*

E. oleracea Martius, nativa da região Oriental, é atualmente plantada em escala comercial em todo o Brasil para o mercado de polpa. A espécie *Euterpe oleracea* foi descrita por Carl Friedrich Philipp von Martius e publicada em *Historia Naturalis Palmarum*, em 1824. Nome científico de *Euterpe oleracea* Mart. conhecida popularmente como açaí-do-

Pará, açáí-do-baixo-Amazonas, açáí-de-touceira, açáí-de-planta e açáí-verdadeiro. Também é conhecido como açáí-de-planta no Amazonas; Jussara e Jussara-de-touceira no Maranhão (MOUSSA, 1997).

A palavra “açáí” tem origem tupi (ya-açaí) e significa “fruto que chora” (OLIVEIRA et al, 2018). A exploração do açáí é muito antiga, desde a época pré-colombiana, cujos frutos eram utilizados pelos índios no preparo dos vinhos, nas festas importantes das aldeias realizadas no período da safra dessa palmeira.

Apresenta um perfil farmacológico atraente, o fruto do açáí é rico em compostos fenólicos com destaque para as antocianinas e principalmente a cianidina. O alto teor de antocianinas confere ao açáí propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, além das antocianinas, o açáí é rico em flavonoides (PETRUK et al., 2017). A composição de nutrientes da polpa de açáí liofilizada é relativamente única para uma fruta, os lipídios compreendem metade do perfil químico da polpa e, é um alimento energético, em comparação com outras frutas, a polpa de açáí liofilizada apresenta maior teor de fibra alimentar total e menor teor de carboidratos totais (OLIVEIRA et al, 2019). A polpa de açáí apresenta uma grande quantidade de proteínas, minerais (cálcio, magnésio, manganês, potássio, cobre, boro, cromo e níquel) e vitaminas (B1 e B6) (OLIVEIRA et al, 2018).

Quadro 1. Perfil fitoquímico dos constituintes da polpa e semente de *Euterpe oleracea* Mart

Parte da planta	Perfil Fitoquímico
Polpa	Ácido vanílico, ácido seringínico, ácido p- hidroxibenzoico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, quercetina, catequina, patulitrina, cianidina, cianidina-3- glicosídeo, cianidina-3-rutinósido (MARTINS et al, 2022; SOUZA et al, 2022).
Semente	Procianidinas, Procianidina C1, ácido protocatecoico, ácido di-hidroxibenzoico fenólico, epicatequinas, epigalocatequina-3-galato (COLARES et al, 2021; FREITAS et al, 2022).

O Brasil gera anualmente cerca de mais de 9 bilhões de dólares americanos em receitas à base de açáí. A popularização do uso do açáí tem garantido mais pesquisas científicas sobre sua origem botânica, notável pelo perfil nutricional e propriedades bioativas (DE SOUZA et al, 2023). Assim, a demanda por açáí tem crescido consideravelmente também nas populações do sudeste e centro-oeste brasileiro (YAMAGUCHI et al., 2015; LAURINDO et al, 2023). Atualmente, o interesse pelo açáí está aumentando não apenas devido ao seu

amplo uso nas indústrias alimentícia e cosmética, mas também devido ao seu potencial no setor farmacêutico, além disso, diferentes partes dessa planta, como frutas, folhas, raízes e óleo de frutas têm sido de fato estudadas para aplicação farmacológica, sugerindo diferentes atividades biológicas de acordo com sua composição química.



Figura 2. Aspecto geral da palmeira e fruto de *Euterpe oleracea* Mart (açai). (Fonte: autor).

2.3.2 Atividades farmacológicas da polpa de *Euterpe oleracea* Mart

O fruto do açai faz parte da economia local, também é encontrado na região de várzea da Amazônia, Maranhão e centro-oeste. A presença de antioxidantes na polpa do açai, atribuindo a ele a característica de alimento funcional, sua capacidade antioxidante dos extratos de açai tem sido associada principalmente ao seu alto teor e composição em antocianinas, pigmentos hidrossolúveis responsáveis pela intensa coloração púrpura do fruto (ARANHA et al, 2020; BARBOSA et al, 2021).

A composição fitoquímica da polpa de açai tem sido bem caracterizada, revelando que este fruto é rico em antocianinas, como a cianidina, principalmente a cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo, são encontradas em maior quantidade nesta espécie, estando relacionadas ao seu potencial antioxidante (PETRUK et al., 2017; BAPTISTA et al, 2021). Também são considerados os componentes hidrossolúveis do açai que inibem o processo de oxidação, prevenindo assim uma série de doenças, incluindo cardiovasculares e neurológicas (CADONA et al, 2021).

Além das antocianinas, os demais compostos fenólicos encontrados são os ácidos vanílico, cafeico e siríngico (PACHECO-PALENCIA et al., 2008; CARVALHO et al., 2017).

Os radicais livres no organismo podem gerar processos de oxidação, altamente prejudicial que leva ao acometimento de doenças e envelhecimento. Entre os compostos constituintes, como a cianidina e a patulitrina. A cianidina é um composto pertencente ao grupo das antocianinas, sendo descrita em estudos por efeitos antimicrobianos (DIAS et al, 2018). Também foi considerado no estudo realizado *in vivo* a partir do extrato da polpa seu efeito gastroprotetor reduzindo a úlcera gástrica em até 83% nas concentrações de 30 e 100mg/kg por via oral, ainda conseguiu diminuir a inflamação e mantendo o equilíbrio oxidativo da mucosa gástrica, assim como também os níveis de TNF-alfa (CURY et al, 2020).

A patulitrina se mostra com grande potencial de reduzir a inflamação, assim como sua atividade antioxidante *in vitro*, possui através do seu mecanismo estrutural a capacidade de inibir a formação e eliminar os radicais livres. Foi demonstrado pela primeira vez que a patulitrina inibiu a inflamação aguda induzida em modelo experimental por carragenina, histamina, ácido araquidônico e 12- *O* -tetradecanoilforbol-13-acetato *in vivo* (YASUKAWA et al, 2013).

Quadro 2. Propriedades farmacológicas da polpa de *Euterpe oleracea* Mart

Ação farmacológica	Referências
Antioxidante	(ALENCAR et al, 2020; ARANHA et al, 2020; COLARES et al, 2021; BARBOSA et al, 2021; MARTINS et al, 2022; SOUZA et al, 2022)
Antimicrobiano	(DIAS et al, 2018; ARANHA et al, 2020 SOUZA et al, 2022; MACIEL-SILVA et al, 2022)
Anti-inflamatória	(SANTAMARINA et al, 2019; SOUZA et al, 2022)
Efeito aterosclerótico	(PALA et al, 2018)
Efeito antitumoral	(ALESSANDRA-PERINI et al, 2018; FILHO et al, 2018; FRAGOSO et al, 2023)
Efeito imunomodulador	(CURY et al, 2020).
Efeitos antineuro-inflamatórios	(CADONA et al, 2021);

2.3.3 Atividades farmacológicas da semente de *Euterpe oleracea* Mart

A semente do açaí pode ser considerada uma fonte para extração de recursos naturais antioxidantes por apresentar em sua composição proantocianidinas e catequinas. A composição fenólica da semente do açaí, contém as formas oligoméricas como os compostos mais abundantes, assim como a presença de catequinas, epicatequinas e proantocianidinas (FREITAS et al, 2022).

Estudos estão sendo desenvolvidos para melhor elucidar suas propriedades farmacológicas. Baseado na descoberta de novos alvos terapêuticos, a maioria dos estudos avaliam a atividade anti-inflamatória e antioxidante, o extrato das sementes de açaí exibe capacidade antioxidante, parcialmente devido ao conteúdo de procianidinas oligoméricas (MARTINS et al, 2022).

Um estudo recente descreveu os efeitos neuroprotetores das procianidinas com capacidade antioxidante mais forte do que as vitaminas C e E (CHEN et al, 2022). Ainda, efeitos protetores contra o estresse oxidativo (LUO et al, 2018). A EGCdiG é um composto derivado da catequina, conhecida por induzir a produção de óxido nítrico a partir de células endoteliais e assim, aumentar a homeostase cardiovascular, ainda, *in vivo* foi demonstrado efeito anti-hipertensivo inibindo a enzima conversora de angiotensina I (OZAROWSKI et al, 2021).

Quadro 3. Propriedades farmacológicas da semente de *Euterpe oleracea* Mart

Ação farmacológica	Referências
Antioxidante	(DA SILVA et al, 2018; SANTOS et al, 2020; SILVA et al, 2021; MONTEIRO et al, 2021; MARTINS et al, 2022;
Anti-inflamatórias	(DA SILVA et al, 2018; MELO et al, 2020; MONTEIRO et al, 2020)
Anti-hipertensiva	(DA SILVA et al, 2018; DA SILVA et al, 2020; VILHENA et al, 2021)
Antitumoral	(SILVA et al, 2014; DA SILVA et al, 2022; FILHO et al, 2023)
Efeito antidiabético	(DE BEM et al, 2018;
Efeito cardiovascular	(DE MOURA et al, 2016; VILHENA et al, 2021)

2.4 Análise computacional *in silico*

As metodologias *in silico* surgem como uma alternativa para a descoberta de potenciais novas drogas, sendo utilizadas para a resolutividade de problemas como o alto custo e o processo demorado associado às metodologias tradicionais (BRUNO et al, 2019). Atualmente os planejamentos racionais de fármacos podem ser baseados na estrutura do alvo (“LBDD – *ligand based Drug Design*”) como os modelos de QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) quando a atividade biológica e a estrutura química são correlacionadas usando métodos de bioinformática ou estatísticos. O (“SBDD - *Structure Based Drug Design*”), docking molecular, é baseado na estrutura do ligante (NAVIEN et al, 2021).

Os estudos dos parâmetros farmacocinéticos de ADME são fundamentais na descoberta de novos fármacos. ADME é o acrônimo de quatro letras para absorção, distribuição, metabolismo e excreção, parâmetros que revelam a farmacocinética dos fármacos. Esses termos foram apresentados juntos pela primeira vez em inglês por Nelson em 1961, reformulando os termos reabsorção, distribuição, consumo e eliminação anteriormente usados por Teorell em 1937 (ALQAHTANI et al 2017; SHAN et al 2022).

A absorção é o processo pelo qual um fármaco entra na corrente sanguínea. Existem muitas vias de administração possíveis, as mais comuns são via oral e intravenosa. A taxa de absorção de um medicamento que entra na circulação (biodisponibilidade) pode ser afetada por muitos fatores, incluindo peso molecular, área de superfície polar topológica (TPSA), solubilidade, ionização e outras propriedades físico-químicas (KAR et al, 2022).

Estes métodos *in silico* incluem também os estudos de docking molecular, quando um ligante ou candidato a fármaco é estudado computacionalmente durante a sua ligação a uma proteína-alvo específica. Devido ao alto grau de sinergismo e complementaridade de conhecimentos entre essas diferentes abordagens, sua combinação pode gerar informações importantes no processo da descoberta de novas drogas, economizando a síntese e testes experimentais de moléculas que não apresentaram atividade biológica satisfatória, segundo os modelos preditivos na abordagem *in silico* (NAVIEN et al, 2021).

A predição baseada no número de proteínas com uma estrutura tridimensional conhecida está aumentando rapidamente. Então, atualmente o RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Biology) um dos maiores bancos de dados do mundo conta com cerca de 170 mil estruturas (GOODSELL et al., 2020). O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias

de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês structure-based drug design) (PINZI et al 2019).

Nesse sentido, o docking molecular está entre um dos métodos *in silico* atualmente que contribuem para o conhecimento de novas abordagens na triagem inicial da descoberta de medicamentos, assim como para o processo de desenvolvimento, também estão entre os mais utilizados em base de dados (PINZI et al, 2019; SHAN et al 2022), pois são baseados em predição de estruturas, fazendo a abordagem se tornar exitosa e eficiente para a descoberta de novos fármacos, principalmente por prever as interações que ocorrem entre as moléculas e seus possíveis alvos biológicos.

2.4.1 Softwares online de análise computacional

O banco de dados encontrado no software SWISS ADME (<http://www.swissadme.ch/>) é utilizado como ferramenta na descoberta de medicamentos, por meio de um portal online, usando o código do composto químico (Canonical SMILES) na plataforma (PUBCHEM), utilizado como uma alternativa de pesquisa através de moléculas químicas para descoberta de futuras atividades preditas *in silico* para a aplicação *in vivo* e *in vitro*.

Nos últimos anos, essas ferramentas on-line *in silico* verificam esses compostos naturais para avaliar características como a farmacocinética, semelhança do medicamento, os dados previstos a partir da sua resposta biológica, propriedade e análise da semelhança medicamentosa dos ligantes, por meio da biodisponibilidade oral prevista para o sítio terapêutico (LAGUNIN et al, 2020).

A predição da semelhança de droga dos ligantes, pode ser realizada pelo filtro LIPINSKI, segundo qual um medicamento oral para ser ativo, necessita cumprir um mínimo de quatro dos cinco critérios para sua atividade de semelhança com o medicamento, então é preciso que os resultados de massa molecular, LogP, doador de hidrogênio, aceitador de hidrogênio e índice de refração molar da molécula seja compatível com os seus parâmetros preconizados pela regra (LIPINSKI et al, 2012).

Os quatro parâmetros utilizados para a previsão de potenciais problemas de absorção podem ser facilmente calculados com qualquer computador e uma linguagem de programação que suporte ou facilite a análise da topologia molecular. Relacionado a 'regra dos 5' prevê que a má absorção ou permeação é mais provável quando há mais de 5 doadores de ligações H, 10 aceitadores de ligações H, o peso molecular (PM) é superior a 500 e o Log calculado P (CLogP) é maior que 5 (ou MlogP > 4,15) (LIPINSKI et al, 2012).

O SWISS ADME utiliza algoritmos abertos para verificar, as propriedades dos ligantes, como modelos próprios para gerar várias predições do mesmo parâmetro, ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), farmacocinética e Log P, que são etapas primordiais para a descoberta de novos fármacos (DAINA et al, 2019).

Para os grandes avanços da indústria farmacêutica se faz necessário a busca da toxicidade de moléculas químicas, em possíveis candidato a fármacos, para prevenir futuros erros nos lançamentos de novos medicamentos ao mercado (RAIES et al, 2016; LU et al, 2017). Os métodos comparativos e de tendência também podem ser utilizados para a predição dessas características toxicológicas das substâncias. O software online Protox – II (https://tox-new.charite.de/prottox_II/) avalia a toxicidade *in silico*, uma plataforma integral como modelo computacional, para realizar a previsão da toxicidade das estruturas, avaliando se podem prejudiciais aos seres humanos, ainda tem como base a similaridade molecular do composto em estudo com o banco de dados disponível (BANERJEE et al, 2018).

Nesse sentido, a plataforma complementa os métodos *in vitro* e *in vivos* existentes prevendo os efeitos da toxicidade das moléculas quando avaliadas, minimizando o tempo, necessidade de testes em animais, reduzindo os custos. Então, para análise de predição é classificado em diferentes níveis de toxicidade, como toxicidade oral, toxicidade orgânica (hepatotoxicidade), parâmetros toxicológicos, como mutagenicidade, carcinotoxicidade, citotoxicidade e imunotoxicidade. Além disso, pode ser medido de forma qualitativa os valores de LD₅₀ (dose letal), quanto qualitativamente, como binário (ativo ou inativo) para certos tipos de células e ensaios ou áreas de indicação, como citotoxicidade, imunotoxicidade e hepatotoxicidade.

A plataforma PASS (Previsão de espectros de atividade para substâncias) (<http://www.way2drug.com/passonline/>) é baseada em computador que fornece diferentes informações sobre a atividade biológica do composto químico com base em sua estrutura química. A versão atual do PASS pode prever mais de 3.750 atividades biológica, modo de ação bioquímica com a ajuda de SMILE canônico obtido do PUBCHEM, e ainda garante uma precisão de 95% em todas as atividades encontradas, isto prevê a atividade em termos de probabilidade, relacionadas com a atividade provável (pa) e provável inatividade (pi) (SHARMA et al., 2018). A partir disso, os valores estão na faixa de 0,000 – 1,000 detalhados em cada resultado, ou seja, a bioinformática fornece informações completas sobre as atividades biológicas de qualquer substância pesquisada. Baseado nesse sentido, reflete o resultado da interação da substância química com diferentes entidades biológicas (FILIMONOV et al, 1996).

O SWISS TARGET PREDCTION é uma ferramenta disponível (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) que visa prever os alvos de proteínas e enzimas mais prováveis de moléculas bioativas, baseado nessas previsões é possível entender melhor os mecanismos moleculares, facilitando possíveis efeitos favoráveis acerca do alvo pesquisado (DAINA et al, 2019).

Esse método se baseia em uma regressão logística de pontuação dupla, em vários subconjuntos de ativos conhecidos relacionados ao tamanho para ponderar parâmetros de similaridade 2D e 3D em uma chamada pontuação combinada superior a 0,5 prevê que as moléculas provavelmente compartilharão um alvo protéico comum na previsão (GFELLER, 2013). Na triagem reversa, o Combined-Score permite calcular para qualquer molécula de consulta, assumida como bioativa, a probabilidade de atingir uma determinada proteína. Como as descrições 2D e 3D das moléculas são complementares, esta triagem reversa baseada em ligantes de pontuação dupla mostra o alto desempenho na previsão de alvos macromoleculares em vários conjuntos de testes a ser realizados (DAINA et al, 2019).

Fica evidente que a aplicação de ferramentas de bioinformática na análise do potencial terapêutico de produtos naturais, como o açaí, representa um avanço significativo no campo da Imunologia. A integração de abordagens computacionais com os conhecimentos tradicionais das ciências da saúde nos fornece um meio eficiente e preciso para explorar a vasta gama de compostos presentes em produtos naturais. Essa combinação de disciplinas abre novos horizontes para a descoberta de terapias inovadoras e nos leva um passo mais perto de compreender a complexa interação entre o sistema imunológico e os compostos bioativos da natureza. Este trabalho busca explorar essa promissora abordagem para avaliar o potencial dos compostos do extrato de polpa e semente de açaí sobre uma via fundamental de ativação dos linfócitos T, contribuindo para o desenvolvimento de novos tratamentos que beneficiarão a saúde e a qualidade de vida humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR AKN. Antioxidant Effects of Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats: Would it Represent a Good Way To Follow? Arq **Bras Cardiol.** 2020.

ALESSANDRA-PERINI J, Rodrigues-Baptista KC, Machado DE, Nasciutti LE, Perini JA. Anticancer potential, molecular mechanisms and toxicity of Euterpe oleracea extract (açai): A systematic review. **PLoS One.** 2018.

ALVES, Michelly Bentes Neves et al, Empirical use of medicinal plants in the treatment of diseases Empirical use of medicinal plants in the treatment of diseases. 2022.

AQUINO, Maria Eduarda et al. Células e tecidos do sistema imune. 2021.

ARANHA LN, Silva MG, Uehara SK, Luiz RR, Nogueira Neto JF, Rosa G, Moraes de Oliveira GM. Effects of a hypoenergetic diet associated with açai (Euterpe oleracea Mart.) pulp consumption on antioxidant status, oxidative stress and inflammatory biomarkers in overweight, dyslipidemic individuals. **Clin Nutr.** 2020.

BAI X, Jiang M, Wang J, Yang S, Liu Z, Zhang H, Zhu X. Cyanidin attenuates the apoptosis of rat nucleus pulposus cells and the degeneration of intervertebral disc via the JAK2/STAT3 signal pathway *in vitro* and *in vivo*. **Pharm Biol.** Dec;60(1):427-436, 2022.

BARBOSA PO, Souza MO, Silva MPS, Santos GT, Silva ME, Bermano G, Freitas RN. Açai (Euterpe oleracea Martius) supplementation improves oxidative stress biomarkers in liver tissue of dams fed a high-fat diet and increases antioxidant enzymes' gene expression in offspring. **Biomed Pharmacother.** 2021.

BANERJEE P., Eckert O.A., Schrey A.K., Preissner R.: ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Res.** 2018.

BAPTISTA SL, Copetti CLK, Cardoso AL, Di Pietro PF. Biological activities of açai (Euterpe oleracea Mart.) and juçara (Euterpe edulis Mart.) intake in humans: an integrative review of clinical trials. **Nutr Rev.** 2021.

BUTORAC C, Muik M, Derler I, Stadlbauer M, Lunz V, Krizova A, Lindinger S, Schober R, Frischauf I, Bhardwaj R, Hediger MA, Groschner K, Romanin C. A novel STIM1-Orai1 gating interface essential for CRAC channel activation. *Cell Calcium.* 2019.

BRUNO A, Costantino G, Sartori L, Radi M. The In Silico Drug Discovery Toolbox: Applications in Lead Discovery and Optimization. **Curr Med Chem**. 2019.

CADONA FC, de Souza DV, Fontana T, Bodenstein DF, Ramos AP, Sagrillo MR, Salvador M, Mota K, Davidson CB, Ribeiro EE, Andrezza AC, Machado AK. Açai (Euterpe oleracea Mart.) as a Potential Anti-neuroinflammatory Agent: NLRP3 Priming and Activating Signal Pathway Modulation. **Mol Neurobiol**. 2021.

CERVELATTI, E. P. et al. Estratégia complementar de atendimento à saúde na cidade ribeirinha de Manicoré-Amazonas Complementary health care strategy in the riverside town of Manicoré-Amazonas. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 12., 2021.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, p. 1262, 1981.

CURY BJ, Boeing T, Somensi LB, Mariano LNB, de Andrade SF, Breviglieri E, Klein-Junior LC, de Souza P, da Silva LM. Açai berries (Euterpe oleracea Mart.) dried extract improves ethanol-induced ulcer in rats. **J Pharm Pharmacol**. 2020.

DAINA, Antoine; MICHELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W357-W364, 2019.

DE ALMEIDA, Juliane Rosalia et al. O enfermeiro frente às práticas integrativas e complementares em saúde na estratégia de saúde da família. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**. 2019.

DE SOUZA SILVA, Anna Paula et al. Phenolic Profile and the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Properties of Açai (Euterpe oleracea) Meal: A Prospective Study. **Foods**. 2023.

DIERCKS BP, Werner R, Weidemüller P, Czarniak F, Hernandez L, Lehmann C, Rosche A, Krüger A, Kaufmann U, Vaeth M, Failla AV, Zobiak B, Kandil FI, Schetelig D, Ruthenbeck A, Meier C, Lodygin D, flügel A, Ren D, Wolf IMA, Feske S, Guse AH. ORAI1, STIM1/2, and RYR1 shape subsecond Ca²⁺ microdomains upon T cell activation. **Sci Signal**. 2018.

DIAS. SMV, Dos Santos RM, Cerávolo IP, Cosenza G, Ferreira Marçal PH, Figueiredo FJB. Euterpe oleracea pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against Staphylococcus aureus, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs. **Microb Pathog**. 2018.

EKIERT HM, Szopa A. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**. 2020.

ERNST IM, Fliegert R, Guse AH. Adenine Dinucleotide Second Messengers and T-lymphocyte Calcium Signaling. **Front Immunol.** 2013.

FERNANDES MS, Machado AK, Assmann CE, Andrade EN, Azzolin VF, Duarte MMMF, Prado-Lima PASD, Riffel RT, Maia-Ribeiro EA, Cadoná FC, Praia R, Barbisan F, Cruz IBMD. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) reduces the inflammatory response triggered in vitro by the antipsychotic drug olanzapine in RAW 264.7 macrophage cells. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2021.

FILHO WEM, et al. Efeito Antitumoral do Extrato da Semente de Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) em Células LNCaP e no Modelo de Carcinoma Sólido de Ehrlich. *Cânceres (Basileia).* 2023.

FILIMONOV, Dmitrii et al. Avaliação de similaridade química através de vizinhanças multiníveis de átomos: definição e comparação com os demais descritores. **Revista de informação química e ciências da computação.** v. 39, n. 4, pág. 666-670, 1999.

FORD CT, Richardson S, McArdle F, Lotito SB, Crozier A, McArdle A, Jackson MJ. Identification of (poly) phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. **Br J Nutr.** 2016.

FRAGOSO MF, Romualdo GR, Vanderveer LA, Franco-Barraza J, Cukierman E, Clapper ML, Carvalho RF, Barbisan LF. Lyophilized açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) attenuates colitis-associated colon carcinogenesis while its main anthocyanin has the potential to affect the motility of colon cancer cells. **Food Chem Toxicol.** 2018.

GFELLER, David; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules. **Bioinformatics,** 2013.

GOODSELL, D. S. et al. RCSB Protein Data Bank: Enabling biomedical research and drug discovery. **Protein Science,** v. 29, n. 1, p. 52-65, set. 2020.

HOTH M. Depletion of intracellular calcium stores activates an outward potassium current in mast and RBL-1 cells that is correlated with CRAC channel activation. *FEBS Lett.* 1996.

KAR S, Roy K, Leszczynski J. In Silico Tools and Software to Predict ADMET of New Drug Candidates. **Methods Mol Biol.** 2022.

LAURINDO LF, Barbalho SM, Araújo AC, Guiguer EL, Mondal A, Bachtel G, Bishayee A. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) in Health and Disease: A Critical Review. **Nutrients.** 2023.

LIPINSKI C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 4-17, 2012.

LIANG X, Zhu W, Lv Z, Zou Q. Molecular Computing and Bioinformatics. **Molecules**. 2019.

LEWIS RS, Cahalan MD. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. **Cell Regul**. 1989.

LU J, Zhang P, Zou X, et al. In silico prediction of chemical toxicity profile using local lazy learning. **Comb Chem High Throughput Screen**. 2017.

MACIEL-SILVA FW, Viganó J, Castro LEN, Sganzerla WG, Buller LS, Martínez J, Rostagno MA, Forster-Carneiro T. Pressurized liquid extraction coupled in-line with SPE and on-line with HPLC (PLE-SPExHPLC) for the recovery and purification of anthocyanins from SC-CO₂ semi-defatted Açai (*Euterpe oleracea*). **Food Res Int**. 2022.

MARQUES ES, Tsuboy MSF, Carvalho JCT, Rosa PCP, Perazzo FF, Gaivão IOM, Maistro EL. First cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic assessment of *Euterpe oleracea* fruit oil (açai) in cultured human cells. **Genet Mol Res**. 2017.

MARTINS GR, Mattos MMG, Nascimento FM, Brum FL, Mohana-Borges R, Figueiredo NG, Neto DFM, Domont GB, Nogueira FCS, de Paiva Campos FA, Sant'Ana da Silva A. Phenolic Profile and Antioxidant Properties in Extracts of Developing Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) Seeds. **J Agric Food Chem**, 2022.

MOUSSA, FARANA; KAHN, FRANCIS. Trois palmiers pour trois capitales amazoniennes. Bulletin de l'Institut Français d'études Andines. 1997.

NAVIEN TN, Thevendran R, Hamdani HY, Tang TH, Citartan M. In silico molecular docking in DNA aptamer development. **Biochimie**. 2021.

OH-HORA M. Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. **Immunol Rev**. 2009.

OLIVEIRA, Aryane Ribeiro et al. Structural and physicochemical properties of freeze-dried açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Science and Technology**. 2019.

OLIVEIRA, Maria do SP; SCHWARTZ, Gustavo. Açai—*Euterpe oleracea*. In: Exotic fruits. **Academic Press**, p. 1-5. 2018.

PALA D, Barbosa, et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) dietary intake affects plasma lipids, apolipoproteins, cholesteryl ester transfer to high-density lipoprotein and redox metabolism: A prospective study in women. **Clin Nutr.** 2018.

RAIES A B, Bajic VB Toxicologia in silico: métodos computacionais para predição de toxicidade química. Wiley Interdisciplinar. Rev. **Computação.** Mol. Ciência. 2016.

RAFFAELLO A, Mammucari C, Gherardi G, Rizzuto R. Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. **Trends Biochem Sci.** 2016.

PARK YJ, Yoo SA, Kim M, Kim WU. The Role of Calcium-Calcineurin-NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. **Front Immunol.** 2020.

PETRUK, G.; Illiano, A.; Giudice, R. D.; Raiola, A.; Amoresano, A.; Rigano, M. M.; Piccoli, R.; Monti, D. M. Malvidin and cyanidin derivatives from açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) counteract UV-A-induced oxidative stress in immortalized 16 fibroblasts. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, 172, 42–51, 2017.

PINZI L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **Int J Mol Sci.** 2019.

PRAKRIYA M, Lewis RS. Store-Operated Calcium Channels. **Physiol Rev.** 2015

PUCK JM. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. **Immunol.** 2019.

SHAN V, Bhaliya J, Patel GM. In silico docking and ADME study of deketene curcumin derivatives (DKC) as an aromatase inhibitor or antagonist to the estrogen-alpha positive receptor (E α +) : potent application of breast cancer. **Struct Chem.** 2022.

SIMONETTI, Paulo Alexandre do Couto et al. Sistema de Avaliação do Potencial para Inovação de Biomoléculas-SInBIOMOL: da biodiversidade Amazônica a fármacos. 2019.

ROCHA, Aline Oliveira. Uma análise sobre o processo de construção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS e o princípio da Integralidade. 2022.

SANTAMARINA AB, Jamar G, Mennitti LV, Ribeiro DA, Cardoso CM, de Rosso VV, Oyama LM, Pisani LP. Polyphenols-Rich Fruit (*Euterpe edulis* Mart.) Prevents Peripheral Inflammatory Pathway Activation by the Short-Term High-Fat Diet. **Molecules.** 2019.

SHARMA, Ms Neha. Identification of molecular targets of potential antidiabetic drugs using prediction of activity spectra for substances and molecular docking. 2018.

SON GY, Subedi KP, Ong HL, Noyer L, Saadi H, Zheng C, Bhardwaj R, Feske S, Ambudkar IS. STIM2 targets Orai1/STIM1 to the AKAP79 signaling complex and confers coupling of Ca²⁺ entry with NFAT1 activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2020.

SUN XL, Xiang ZM, Xie YR, Zhang N, Wang LX, Wu YL, Zhang DY, Wang XJ, Sheng J, Zi CT. Dimeric(-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation of lung cancer cells by inhibiting the EGFR signaling pathway. **Chem Biol Interact**. 2022.

SOUZA Silva AP, de Camargo AC, Lazarini JG, Franchin M, Sardi JCO, Rosalen PL, de Alencar SM. Phenolic Profile and the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antimicrobial Properties of Açai (*Euterpe oleracea*) Meal: A Prospective Study. **Foods**. 2022.

TREBAK M, Kinet JP. Calcium signalling in T cells. **Nat Rev Immunol**. 2019.

QIU, Ruoyi; LEWIS, Richard S. Características estruturais de STIM e Orai subjacentes à entrada de cálcio operada por loja. **Current Opinion in Cell Biology**. 2019.

VAETH M, Kahlfuss S, Feske S. CRAC Channels and Calcium Signaling in T Cell-Mediated Immunity. **Trends Immunol**. 2020 Oct;41(10):878-901. Epub. 2020.

VERSTRAETEN SV, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG, Oteiza PI. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radic Biol Med**. 2003.

VEBER D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y., Smith B.R., Ward K.W., Kopple K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **J. Med. Chem**. 2002

VILLALÁIN J. Procyanidin C1 Location, Interaction, and Aggregation in Two Complex Biomembranes. **Membranes** (Basel). 2022.

WIK JA, Skålhegg BS. T Cell Metabolism in Infection. **Front Immunol**. Mar. 2022.

WEIDINGER C, Shaw PJ, Feske S. STIM1 and STIM2-mediated Ca (2+) influx regulates antitumour immunity by CD8(+) T cells. **EMBO Mol Med**. 2013.

YASUKAWA K, Kasahara Y. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model. **Int J Inflamm**. 2013.

ZARRICUETA ML, Fagundes FL, Pereira QC, Pantaleão SQ, Santos RCD. Relationship between Hormonal Modulation and Gastroprotective Activity of Malvidin and Cyanidin Chloride: In Vivo and In Silico Approach. **Pharmaceutics**. 2022.

ZHANG X, Wu F, Yang N, Zhan X, Liao J, Mai S, Huang Z. In silico Methods for Identification of Potential Therapeutic Targets. **Interdiscip Sci**. 2022.

ZHANG N, Pan H, Liang X, Xie J, Han W. The roles of transmembrane family proteins in the regulation of store-operated Ca^{2+} entry. **Cell Mol Life Sci**. 2022.

ZWEIFACH A, Lewis RS. Mitogen-regulated Ca^{2+} current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca^{2+} stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar por ensaios *in silico* o potencial modulador dos metabólitos do extrato da polpa e semente da *E. oleracea* Mart. sobre a via de sinalização Orai1/STIM/NFAT de linfócitos T.

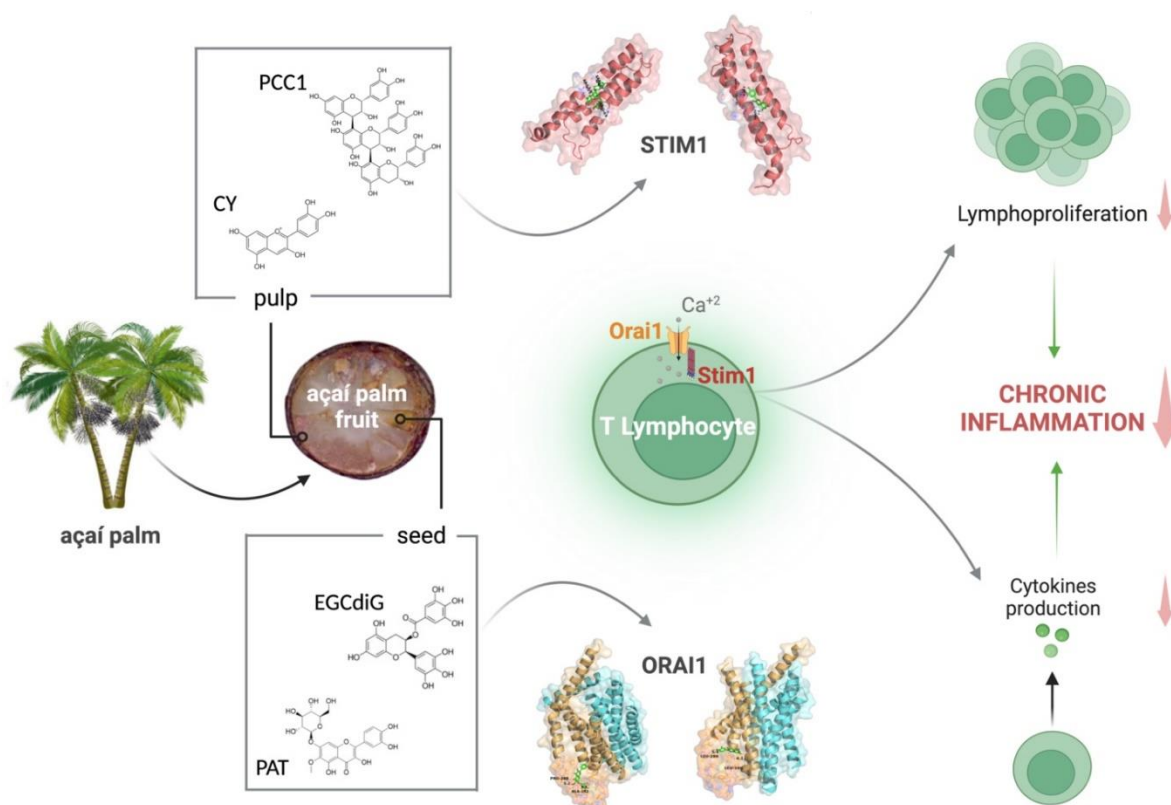
3.2 Objetivos específicos

- Predizer a biodisponibilidade oral dos compostos do extrato da polpa e semente da *E. oleracea* Mart em relação às características físico-químicas;
- Avaliar os parâmetros farmacocinéticos dos compostos selecionados;
- Identificar a toxicocinética dos compostos do extrato da polpa e semente da *E. oleracea* Mart *in silico*;
- Avaliar *in silico* as possíveis atividades biológicas e alvos moleculares dos compostos selecionados;
- Analisar *in silico* o potencial de interação molecular dos metabólitos selecionados com as proteínas Orai1, STIM1 e NFAT.

Capítulo I

Artigo original submetido

Resumo gráfico



Os fitoquímicos procianidina C1 (PCC1), Epigallocatequina-3,3-di-O-Galato (EGCdiG), patulitrina (PAT) e cianidina (CY) do extrato da polpa e semente do açaí - *E. oleracea* Mart - demonstraram potencial, em testes *in silico* de docagem molecular, para se ligarem ao canal de cálcio Orai1 e à sua proteína reguladora STIM1, moléculas ativadoras dos linfócitos T. Com isso, esses compostos apresentam potencial para modular essa célula e controlar processos inflamatórios crônicos.

Artigo submetido à Revista Natural Products and Bioprospecting (ISSN: 2192-2209)
(FI: 4.7, Qualis A3) (Área Medicina I)

**Nova visão sobre a ativação de linfócitos T por metabólitos de *Euterpe oleracea* Mart:
uma avaliação in silico da via Orai1/STIM1/NFAT**

Potencial farmacológico de metabólitos de *Euterpe oleracea* Mart sobre a via
Orai1/STIM1/NFAT de ativação de linfócitos T

Nágila Caroline Fialho Sousa¹, Dayanne Silva Freitas², Nayna Sabrina Vieira³, Kelly Portela Sousa¹, Angela Falcai⁴, Cláudia Quintino da Rocha⁵, Lucilene Amorim Silva¹, Paulo Vitor Soeiro-Pereira^{1*}

Afiliações:

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís, MA, Brasil; nagila.fialho@discente.ufma.br, kelly.portela@discente.ufma.br, lucilene.silva@ufma.br, paulo.soeiro@ufma.br
2. Coordenação do Curso de Enfermagem, Centro de Ciências de Pinheiro, UFMA, Estrada Pinheiro/Pacas, Km 10, s/n – Enseada, Pinheiro, MA, Brasil; dayanne.freitas@ufma.br
3. Curso de Farmácia, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís, MA, Brasil; nayna.vieira@discente.ufma.br
4. Mestrado em Meio Ambiente, Universidade CEUMA, Rua Anapurus, 1, São Luís, MA, Brasil; angela.falcai@ceuma.br
5. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, São Luís, MA, Brasil. rocha.claudia@ufma.br

**Nova visão sobre a ativação de linfócitos T por metabólitos de *Euterpe oleracea* Mart:
uma avaliação *in silico* da via Orai1/STIM1/NFAT**

Potencial farmacológico de metabólitos de *Euterpe oleracea* Mart sobre a via
Orai1/STIM1/NFAT de ativação de linfócitos T

RESUMO

A espécie amazônica *Euterpe oleracea* Mart, o açaí, é reconhecida por suas propriedades nutricionais e atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora. No entanto, ainda não compreendemos completamente como seus componentes afetam o sistema imunológico. Neste trabalho realizamos ensaios *in silico* para o potencial imunomodulador de quatro (procianidina C1, PCC1, epigallocatequina-3,3-di-O-Galato, EGCdiG, patulitrina, PAT, e cianidina, CY) dos principais metabólitos secundários dos extratos de semente e polpa de açaí na via Orai1/STIM1/NFAT de ativação dos linfócitos T. Todos os compostos avaliados apresentaram propriedades físico-químicas relevantes, sendo promissores por alguma via de administração na análise de biodisponibilidade radar, com destaque para Cy e a PAT com a melhor biodisponibilidade oral. De acordo com os parâmetros farmacocinéticos, esses dois compostos mostraram potencial para absorção no trato gastrointestinal e penetração pela pele. As previsões dos espectros de atividade biológica via PASS revelaram que todos os compostos têm potencial para diversas atividades, incluindo inibição da peroxidase lipídica, eliminadores de radicais livres, antioxidantes e regulação da resposta imune-inflamatória. Ainda, Cy e PAT apresentaram baixo potencial tóxico (hepatotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade). O estudo de docagem molecular demonstrou que CY (-7.0 Kcal/mol) e PAT (-8.3 Kcal/mol) ligam-se ao sítio de regulação de Orai1 (respectivamente, Ala282 e Phe171), assim como a EGCdiG (-7.0 Kcal/mol) e CY (-6.0 Kcal/mol) tem afinidade pelo sítio de ativação/regulação de STIM1 (Gly22 e Asp32, respectivamente). Nosso estudo propõe a avaliação de cianidina e patulitrina como moduladores da resposta de linfócitos T pelo seu potencial de modulação da via Orai1/STIM1.

Palavras-chave: Açaí; Canal de cálcio; Imunomodulação; Docagem molecular; Biodisponibilidade oral.

ABSTRACT

The Amazonian *Euterpe oleracea* Mart, commonly known as açai, is renowned for its nutritional properties and antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities. However, a comprehensive understanding of how its components affect the immune system is still lacking. In this study, we conducted *in silico* investigations into the potential of four primary secondary metabolites extracted from açai seeds and pulp — procyanidin C1 (PCC1), epigallocatechin-3,3-di-O-gallate (EGCdiG), patulitrine (PAT), and cyanidin (CY) — on the Orai1/STIM1/NFAT pathway for T-cell activation. All evaluated compounds exhibited relevant physicochemical properties, showing promise for various administration routes in radar bioavailability analysis. Notably, CY and PAT displayed the best oral bioavailability profiles based on pharmacokinetic parameters, indicating potential for absorption within the gastrointestinal tract and skin penetration. PASS predictions of biological activity spectra revealed that all compounds have potential for various activities, including peroxidase inhibition, free radical scavenging, antioxidant effects, and regulation of the immune-inflammatory response. Moreover, CY and PAT exhibited low toxic potential in hepatotoxicity, cytotoxicity, and mutagenicity. Molecular docking analysis demonstrated that CY (-7.0 kcal/mol) and PAT (-8.3 kcal/mol) bind to the Orai1 regulatory site (Ala282 and Phe171, respectively), while EGCdiG (-7.0 kcal/mol) and CY (-6.0 kcal/mol) exhibited affinity for the STIM1 activation/regulatory site (Gly22 and Asp32, respectively). Our study proposes the evaluation of cyanidin and patulitrine as modulators of T-cell responses due to their potential modulation of the Orai1/STIM1 pathway.

Keywords: Açai; Calcium channel; Immunomodulation; Molecular docking; Oral bioavailability.

1 INTRODUÇÃO

Os linfócitos T, principalmente os auxiliares (CD4+), modulam os demais mecanismos da resposta imune, sendo fundamentais para construção da imunidade e formação da memória imunológica (WIK et al, 2022; DONG et al, 2021). A falha no funcionamento dessas células leva a condições graves, como a imunodeficiência combinada grave (SCID) (PUCK et al, 2019). A ativação dos linfócitos T é um processo complexo que envolve a entrada de cálcio na célula, mediada por canais como Orai1, ativados/regulados por proteínas como STIM1 (Stromal interaction molecule) (VAETH et al, 2020). O estímulo dos linfócitos T ativa a proteína STIM1, que migra da membrana do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, ativando os canais de cálcio Orai1, desencadeando o influxo de cálcio (VAETH et al, 2020). A elevação do nível intracelular de cálcio leva a ativação do fator de transcrição NFAT (nuclear factor of activated T cells), essencial desde a linfoproliferação até a produção de citocinas (PARK et al, 2020).

Dada a importância dessa via na resposta adaptativa, as proteínas Orai1/STIM1/NFAT tem se tornado um alvo de pesquisa farmacológica para regular a função dos linfócitos T (WEIDINGER et al, 2013; VAETH et al, 2020). Nesse contexto, os produtos naturais, como *Euterpe oleracea* Mart (açai) e seus compostos, têm se destacado como promissores na busca por reguladores da resposta dos linfócitos T (MARQUES et al, 2017). Estudos sugerem que compostos presentes no açai podem modular a atividade dessas células, reduzindo a inflamação e aumentando a resposta imunológica protetora (FORD et al, 2016; DORNELES et al, 2021; PERINI et AL, 2023).

O açai é rico em compostos fenólicos, como antocianinas, que possuem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (FERNANDES et al, 2021). Em relação aos compostos majoritários obtidos do extrato do açai, a procianidina C1 (PCC1) demonstrou propriedades antiproliferativas, induzindo apoptose em células de câncer de mama; também apresentou efeitos no contexto da diabetes e doenças cardiovasculares (VILLALÁIN et al, 2022; PERINI et AL, 2023). A epigallocatequina-3-galato (EGCdiG), é uma substância polifenólica com efeitos anticancerígenos, anti-inflamatórios e antioxidantes (SUN et al, 2022). As antocianinas, em particular a cianidina (CY), exibem atividades anti-inflamatória, anti-apoptótica e antioxidante (BAI et al, 2022). A patulitrina (PAT) também demonstrou potencial em reduzir a inflamação, assim como sua atividade antioxidante *in vitro* (YASUKAWA et al, 2013).

É importante destacar que o desenvolvimento de novos medicamentos é um processo longo, caro e incerto. Nos últimos anos, os métodos computacionais têm desempenhado um papel fundamental na redução de custos e tempo nas fases iniciais desse processo (ZHANG et al, 2022). Os estudos computacionais permitem a análise de características importantes e a seleção de compostos promissores de maneira eficiente, evitando o desperdício de recursos em substâncias menos promissoras e reduzindo a necessidade de testes em animais e humanos (LIANG et al, 2019).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar computacionalmente quatro dos compostos majoritários dos extratos de semente e polpa de *Euterpe oleracea* Mart, através de estratégias *in silico*. Os resultados desse estudo orientarão futuras pesquisas experimentais para confirmar o potencial desses compostos no desenvolvimento de terapias alternativas para doenças inflamatórias e autoimunes. Além disso, fornecem novas perspectivas sobre o uso de produtos naturais como fonte de compostos bioativos com potencial terapêutico, envolvendo a modulação da resposta imunológica pela regulação das vias dos linfócitos T.

2 Material e Métodos

2.1 Seleção e preparação dos Ligantes

Para este estudo, selecionamos 4 compostos fitoquímicos (Figura 1), procianidina C1 (PCC1, PubChem: 169853), Epigallocatequina-3,3-di-O-galato (EGCdiG, PubChem: 467300), patulitrina (PAT, PubChem: 5320435) e cianidina (Cy, PubChem: 128861), com base em sua identificação nos extratos de semente e polpa de açaí preparados pelo nosso grupo de estudo e trabalhos anteriores (FERNANDES et al, 2021; CARVALHO et al., 2021). Não existem estudos prévios sobre a atividade desses compostos na sinalização Orai1/STIM1/NFAT de linfócitos T.

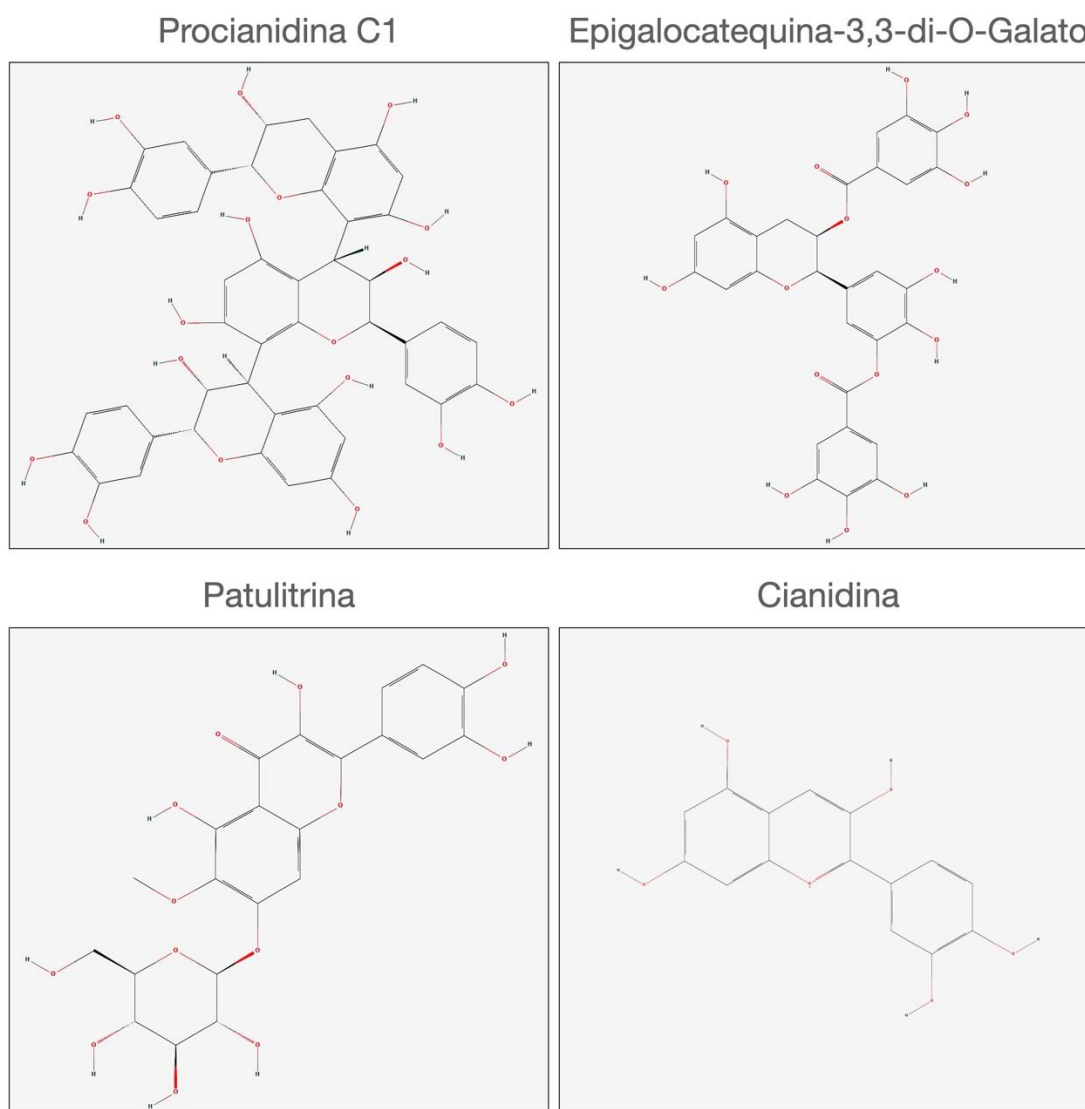


Figura 1. Estrutura química dos compostos secundários dos extratos de semente e polpa de *E. oleracea* Mart selecionados para avaliação se seu potencial na via Orai1/STIM1/NFAT.

As estruturas desses compostos foram obtidas do banco de dados público do NIH/NCBI (National Institutes of Health, National Center for Biotechnology Information, EUA), PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), e baixadas como uma representação tridimensional (3D) em formato estrutural .sdf. Os ligantes foram convertidos para o arquivo .pdb através do software Discovery Studio Visualizer (BIOVIA, San Diego, CA, EUA), no qual suas energias foram minimizadas.

2.2 Análise das propriedades físico-químicas e de semelhança com medicamentos

Para análise e cálculo das características físico-químicas, bem como a previsão de parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, propriedades farmacocinéticas, e similaridade a drogas foi utilizado o software online SwissADME (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Suíça, <http://www.swissadme.ch/>). Essa avaliação fornece uma predição qualitativa com base nos parâmetros quantitativos farmacocinéticos para a potencial drogabilidade dos compostos selecionados em um contexto de administração oral, usando a regra de Lipinski (BENET et al., 2016). Esta estabelece que pelo menos quatro parâmetros de cinco requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade: possuir miLogP menor ou igual a 5,00; Massa molecular (MM) menor ou igual a 500 g.mol^{-1} ; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 Å² ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula 10.

2.3 Avaliação dos parâmetros farmacocinéticos

Os comportamentos farmacocinéticos dos compostos selecionados também foram avaliados usando software SwissADME. Os vários parâmetros considerados incluíram absorção intestinal, relação com a barreira hematoencefálica (BHE), atividade potencial sobre célula Caco-2 (células extraídas do adenocarcinoma de colorretal humano), metabolismo relacionado ao substrato da glicoproteína P, ação sobre o citocromo P450 e penetração na pele.

2.4 Avaliação dos parâmetros toxicológicos

Para avaliação dos alvos de toxicidade foi utilizado o PRO TOX-II (BANERJEE et al., 2018, https://tox-new.charite.de/protox_II/), que determina as reações adversas a medicamentos e efeitos tóxicos. As doses tóxicas são consideradas como valores de LD50 em mg/kg de peso corporal. O LD50 é a dose letal mediana, significando a dose na qual 50% dos sujeitos de teste morrem após a exposição a um composto. São classificadas mediante, a Classe: I- fatal se ingerido ($LD50 \leq 5$), II- fatal se ingerido ($5 < LD50 \leq 50$), III- III: tóxico se ingerido ($50 < LD50 \leq 300$), IV- nocivo se ingerido ($50 < LD50 \leq 300$), V- pode ser nocivo se ingerido ($2000 < LD50 \leq 5000$) e VI- não tóxico ($LD50 > 5000$).

A previsão aguda dos alvos pode ser prevista em alvos mais específicos, avaliando a hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade dos compostos. Possibilitando o valor da dose letal (LD 50), órgãos, tipo de predição classificados como ativos e inativos e probabilidade do alvo. Assim, prevendo uma possível ligação a alvos de toxicidade usando uma coleção de farmacóforos baseados em ligantes de proteínas.

2.5 Predição computacional de espectros de atividade biológica

O programa de computador PASS (FILIMONOV et al., 1999; LAGUNIN et al, 2011) foi utilizado para determinar as possíveis atividades biológicas dos compostos da espécie. A estimativa foi baseada nas relações estrutura-atividade a partir de um amplo banco de dados específicos conhecidos sobre toxicidade de outros compostos de diversas origens. A análise foi realizada através de MNA, multinível de vizinhança de átomos, com previsão simultaneamente de até 3678 tipos de atividade biológicas e precisão média de cerca de 95% (validação cruzada *leave-one-out*) com base na fórmula estrutural do composto. Os resultados são expressos como Pa (maior probabilidade de atividade) e Pi (menor probabilidade de atividade), seguindo o estabelecido na literatura, para este trabalho utilizou-se atividades com Pa acima de 0,7 (70%) (FILIMONOV et al., 1999).

2.6 Previsão de perfis de interação com alvos farmacológicos

O software SWISS TARGET PREDICTION (ferramenta online, Swiss Institute of Bioinformatics) desde 2014, realiza a previsão de alvos baseados em ligantes para qualquer molécula bioativa. Foi utilizado para estimar os alvos macromoleculares mais prováveis para os compostos identificados na espécie de *Euterpe oleracea* Mart. Para isso, a previsão foi baseada em uma combinação de similaridade 2D e 3D com uma biblioteca de 370.000 ativos conhecidos em mais de 3000 proteínas de três espécies diferentes. Ainda, calcula a similaridade entre os compostos de consulta e aqueles compilados em coleções curadas e limpas de ativos conhecidos em ensaios de ligação experimentais bem definidos (DAINA et al, 2019).

2.7 Seleção das proteínas

Três proteínas foram selecionadas como alvos para docagem no contexto da ativação de linfócitos T e baixadas do banco de dados de proteínas PDB (RCSB Protein DataBank, <https://www.rcsb.org/>), incluindo Orail (de *D. melanogaster*, altamente homóloga ao Orail humano, código PDB 4HKR), STIM1 (domínio CC1 regulador de Orail, código PDB 6YEL), e NFAT (extraído do complexo NFAT/calcineurina, código PDB 2JOG) (ZHOU et al., 2020). Os softwares SWISS-PdbViewer (JOHANSSON et al., 2012) e Discovery Studio Visualizer foram usados para a minimização de energia das proteínas-alvo, e retirada de heteroátomos, moléculas de água e duplicações de cadeias homólogas. Estas preparações são importantes para não ocorrer prejuízo nas simulações de interação entre os ligantes e as proteínas.

2.8 Docagem molecular

As estruturas de proteínas foram baixadas no formato PDB, do RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), e o conjunto de ferramentas MGL Tools foi usado para convertê-las para o formato PDBQT (do inglês, *Protein Data Bank, Partial Charge (Q) and Atom Type (T)*). As proteínas foram preparadas pela adição de átomos de hidrogênio polares, retirada de cadeias duplicadas (com sítios motivos moleculares semelhantes) e heteroátomos utilizando o software Discovery Studio Visualizer. Estas preparações são importantes para não ocorrer prejuízo nas simulações de interação entre os ligantes e as proteínas. A docagem

molecular foi realizada no Programa PyMOL (DeLano, 2002) através do plugin para o AutoDock Vina 4.2, DockingPie 1.2.1 (RUIZ-CARMONA et al., 2014). O tamanho e a dimensão da caixa de grade foram selecionados usando as coordenadas dos sítios ativos e/ou de regulação da função das proteínas, mesmo quando esta regulação consiste na interação com outras moléculas da via. A visualização da interação proteína-ligante foi realizada usando o próprio PyMOL e o Discovery Studio Visualizer para a apresentação em duas e três dimensões.

3 RESULTADOS

3.1 Análise físico-química dos compostos

Os compostos mostraram propriedades físico-químicas variáveis, conforme Tabela 1. A PCC1 apresentou maior peso molecular (866,77), enquanto a CY apresentou o menor peso molecular (287,24). Patulitrina mostrou o menor valor de LogP (-2,85), enquanto a cianidina exibiu o maior valor de LogP (0,32). A EGCdiG mostrou as ligações rotacionais mais altas, enquanto a cianidina revelou as ligações rotacionais mais baixas. A PCC1 apresentou os maiores receptores de ligações de hidrogênio, enquanto a cianidina apresentou os menores. Da mesma forma, a PCC1 apresentou o maior valor de doadores de hidrogênio, enquanto a cianidina exibiu uma menor energia de ligação de H. A PCC1 também apresentou o máximo área de superfície, enquanto a cianidina apresentou a menor área de superfície.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos compostos selecionados por análise in silico.

Compostos	PM	LogP	Ligações rotativas	No de receptores de H	No de doadores de H	TPSA
Procianidina C1	866,77	-1,11	5	18	15	331,14
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	610,5	-0,66	7	15	10	264,13
Patulitrina	494,4	-2,85	5	13	8	219,74
Cianidina	287,24	0,32	1	6	5	114,29

PM: peso molecular; LogP: coeficiente de partição; H: hidrogênio; TPSA (*topological surface area*): área de superfície polar topológica (Å^2)

3.2 Estimativa da biodisponibilidade oral teórica dos compostos identificados no extrato da polpa e semente de *Euterpe oleracea Mart*

Os parâmetros físico-químicos avaliados na primeira etapa foram utilizados para avaliação de comportamento dos compostos selecionados semelhante a medicamentos, seguindo as regras de Lipinsk, Ghose, Veber, Egan e de Muegge (GHOSE et al, 1999; EGAN et a, 2000; LIPINSKI et al, 2012; MUEGGE et al, 2001; VEBER et al, 2002). A tabela abaixo (Tabela 2) demonstra que a PCC1, a EGCdiG e PAT não

apresentaram boa disponibilidade oral favorável. No entanto, a CY foi aprovada em todos os modelos de avaliação testados. De todo modo, a não viabilidade de uso oral para tais compostos não os torna menos promissores.

Tabela 2. Semelhança com drogas dos compostos selecionados por análise in silico.

Compostos	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Score *
Procianidina C1	Não	Não	Não	Não	Não	0,17
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	Não	Não	Não	Não	Não	0,17
Patulitrina	Não	Não	Não	Não	Não	0,17
Cianidina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	0,55

**Abbot Bioavailability Score*: probabilidade de um composto ter pelo menos 10% de biodisponibilidade oral em ratos ou permeabilidade mensurável em células Caco-2.

A análise de radar, envolvendo a lipofilicidade, flexibilidade, peso molecular, polaridade, solubilidade em água e insaturação, foi realizada para todos os compostos estudados (Figura 2). Esses parâmetros traduzem de forma dinâmica o comportamento de semelhança com drogas para os compostos avaliados. Na análise a área rosa representa a faixa ideal de uma propriedade particular e a linha vermelha a atividade do composto. Como citado anteriormente, mesmo a PCC1, EGCdiG e PAT não sendo aprovadas em todas as regras de biodisponibilidade oral, nesse cenário os compostos mostraram-se promissores para alguma via de administração.

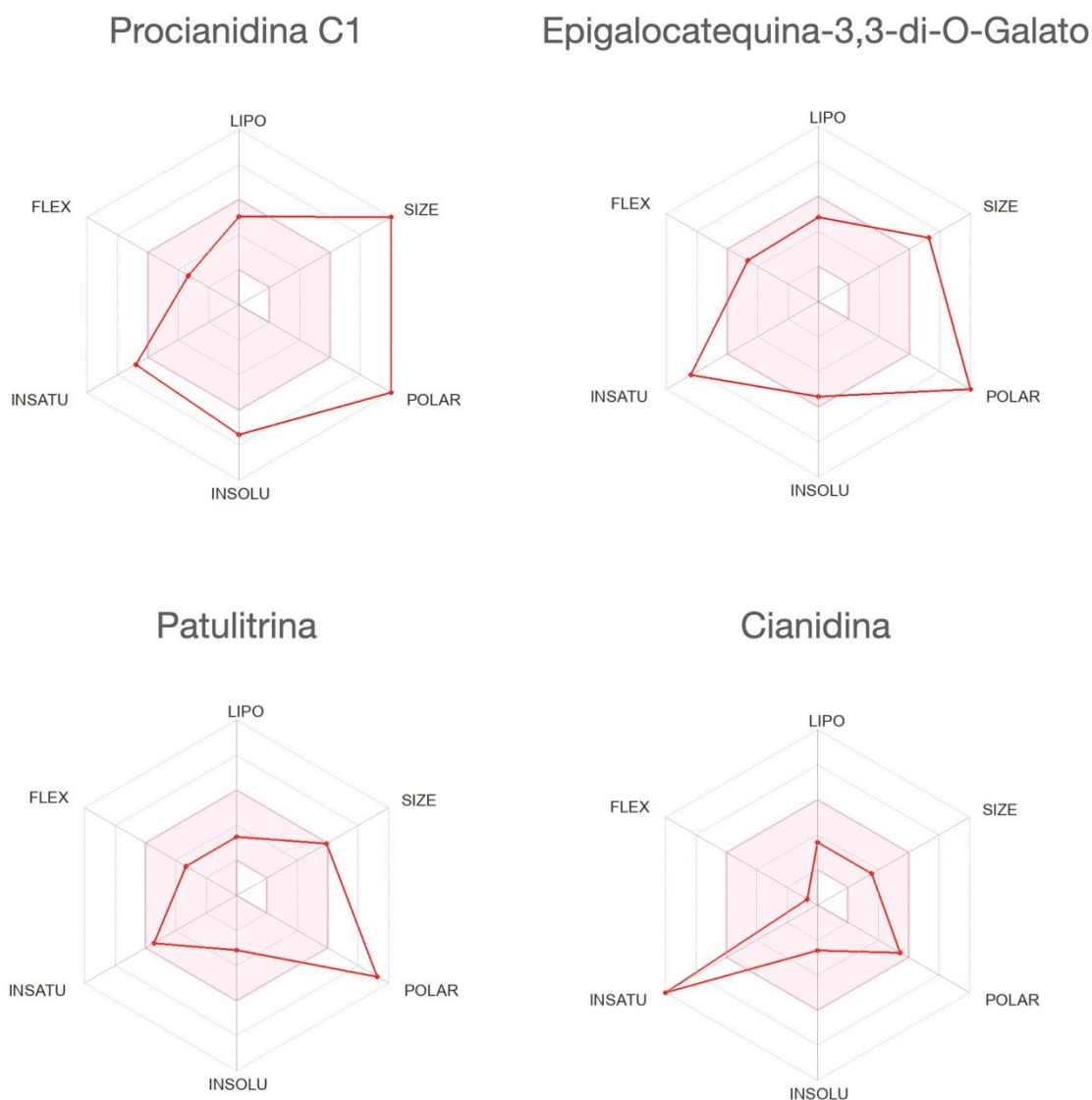


Figura 2. Análise “radar” de biodisponibilidade oral dos compostos selecionados. Esta avaliação incluiu os parâmetros lipofilicidade segundo XLOGP3 (LIPO), flexibilidade de acordo com ligações rotativas (FLEX), peso molecular (SIZE), polaridade (POLAR), insolubilidade em água por escala logS (INSOLU) e insaturação conforme a fração no carbono na hibridação SP3 (INSATU). A região colorida (vermelho claro) do gráfico representa a zona físico-química adequada para biodisponibilidade oral, refletindo um bom perfil farmacocinético e farmacológico.

3.4 Comportamento farmacocinético

Os compostos não apresentaram potencial para ultrapassar a barreira hematoencefálica. CY mostrou capacidade absorptiva no TGI e pele, assim como, pelo substrato da glicoproteína P (SGP), penetração pela pele e inibição pela CYP1C2. No

entanto, os compostos PCC1, EGCdiG e PAT mostraram baixa absorção pelo TGI corroborando com os resultados da biodisponibilidade oral (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros farmacocinéticos dos compostos selecionados por análise in silico.

Compostos	TGI	BHE	PGP	Log Kp	CYP1 A2	CYP2C 19	CYP2 C9	CYP2 D6	CYP3 A4
PCC1	Baixa	Não	Sim	-9,24	Não	Não	Não	Não	Não
EGCdiG	Baixa	Não	Não	-7,94	Não	Não	Não	Não	Não
PAT	Baixa	Não	Não	-9,08	Não	Não	Não	Não	Não
CY	Alta	Não	Sim	-7,51	Sim	Não	Não	Não	Não

PCC1: procianidina C1; EGCdiG: Epigallocatequina-3,3-di-O-galato; PAT: patulitrina; CY: cianidina; TGI: absorção pelo trato gastrointestinal; BHE: penetração pela barreira hematoencefálica; PGP: substrato de glicoproteína P; Log Kp: penetração pela pele; CYP: inibição do citocromo P450, 1A2, 2C19, 2C9, 2D6 e 3A4.

3.5 Análise Toxicocinética de Compostos Naturais Selecionados

Um dos principais desafios para o desenvolvimento de fármacos é a avaliação de sua toxicidade em seres humanos. Atualmente, métodos toxicológicos in silico estão demonstrando enorme utilidade na produção de informação para a indústria farmacêutica (SIMONETTI et al, 2019). Pela análise PRO-TOX II, todos os compostos apresentam baixa toxicidade para os parâmetros avaliados (hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade) (Tabela 4).

Tabela 4. Predição de toxicidade dos compostos selecionados utilizando ProTox-II.

Composto	LD50 (mg/Kg)	Classe	Alvo	Predição	Probabilidade
Procianidina C1	2500	5	Hepatotoxicidade	Inativo	0.74
			Carcinogenicidade	Inativo	0.54
			Imunotoxicidade	Ativo	0.91
			Mutagenicidade	Inativo	0.59

			Citotoxicidade	Inativo	0.80
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	1000	4	Hepatotoxicidade	Inativo	0.73
			Carcinogenicidade	Inativo	0.57
			Imunotoxicidade	Inativo	0.59
			Mutagenicidade	Inativo	0.53
			Citotoxicidade	Inativo	0.80
Patulitrina	5000	5	Hepatotoxicidade	Inativo	0.83
			Carcinogenicidade	Inativo	0.90
			Imunotoxicidade	Ativo	0.98
			Mutagenicidade	Inativo	0.65
			Citotoxicidade	Inativo	0.58
Cianidina	5000	5	Hepatotoxicidade	Inativo	0.72
			Carcinogenicidade	Ativo	0.61
			Imunotoxicidade	Inativo	0.93
			Mutagenicidade	Inativo	0.58
			Citotoxicidade	Inativo	0.94

LD50(Valor da dose letal): dose letal; Classe IV: nocivo se ingerido ($300 < LD50 \leq 2000$); Classe V: pode ser prejudicial se ingerido ($2000 < LD50 \leq 5000$).

3.6 Predição dos espectros de atividade biológica

As análises das atividades biológicas foram realizadas para os compostos identificados no extrato de *Euterpe oleracea* Mart conforme descrito na metodologia. Nos ensaios, considerou-se uma $Pa \geq 70\%$. Todos os compostos apresentaram resultados superiores a 10 atividades biológicas potenciais, dentro do valore de cutoff. As principais previsões foram relacionadas com efeitos de inibidores da peroxidase lipídica, eliminadores de radicais livres, antioxidante, além de mecanismos importantes para regulação da resposta imune-inflamatória (Tabela 5).

Tabela 5. Previsão in silico dos espectros de atividade biológica dos compostos selecionados.

Composto	Atividade prevista	Pa	Pi
Procianidina C1	Intesificador de expressão TP53	0,954	0,003

	Intesificador de expressão HMOX1	0,901	0,003
	Inibidor da expressão HIF1A	0,845	0,009
	Inibidor de quinase	0,826	0,005
	Antioxidante	0,803	0,003
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	Intesificador de expressão HMOX1	0,981	0,001
	Eliminador de radicais livres	0,950	0,001
	Intesificador de expressão TP53	0,925	0,004
	Inibidor de peroxidase lipídica	0,938	0,002
	Intesificador de expressão APOA1	0,830	0,003
Patulitrina	Eliminador de radicais livres	0,981	0,001
	Agonista de integridade de membrana	0,968	0,002
	Inibidor de peroxidase lipídica	0,963	0,002
	Antagonista de receptor de anafilatoxina	0,948	0,002
	Inibidor de NADPH oxidase	0,936	0,001
Cianidina	Agonista de integridade de membrana	0,965	0,003
	Inibidor da expressão HIF1A	0,936	0,004
	Intesificador de expressão TP53	0,858	0,007
	Intesificador de expressão APOA1	0,841	0,003
	Inibidor de quinase	0,831	0,005

Pa: probabilidade de apresentar a atividade descrita; Pi: probabilidade de não apresentar a atividade descrita (inativo).

3.7 Previsão de perfis de interação com alvos farmacológicos

Os fármacos são classificados basicamente em dois grupos, estruturalmente inespecíficos, são os que dependem exclusivamente de suas características físico-químicas, como coeficiente de partição e pKa, para promoverem o efeito biológico, como exemplo os anestésicos gerais, e os estruturalmente específicos, que para exercerem seus efeitos biológicos com uma determinada biomacromolécula alvo, que apresenta na maior parte dos casos propriedades de enzima, proteína sinalizadora (receptor), canal iônico ou ácido nucléico, e com isso precisam se ligar seletivamente a uma biomacromolécula-alvo, como os alvos identificados nesta etapa (BERNARDI, 2022).

Na tabela abaixo (Tabela 6), estão apresentados os possíveis alvos moleculares de cada composto com suas respectivas classes. De forma geral, corroborando com os dados anteriores, os compostos apresentam supostos alvos moleculares muito relacionados com os espectros de atividade biológica previstos. Por exemplo, a procianidina C1 tem a enzima ciclooxigenase 1 como um de seus alvos. Já EGCdiG apresenta o transportador ativo primário como a glicoproteína P, a PAT apresenta relação de ligação possível com a citocina inflamatória TNF alfa. Por fim, a CY através da enzima e antígeno de diferenciação de linfócito CD38.

Tabela 6. Previsão dos alvos moleculares de compostos de *E. oleracea* Mart por análise in silico.

Compostos	Alvo	Classe do alvo	Probabilidade*
Procianidina C1	Metaloproteinase de matrix 9	Protease	0.362
	Metaloproteinase de matrix 2	Protease	0.362
	Fator de crescimento da placenta	Proteína não classificada	0.140
	Fator de crescimento vascular endotelial A	Proteína secretada	0.140
	Ciclooxigenase-1	Oxidoreductase	0.073
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	P-glicoproteína 1	Transportador ativo primário	0.236
	Regulador de apoptose Bcl-2	Outro canal iônico	0.226
	Metaloproteinase de matrix 2	Protease	0.198
	Metaloproteinase de matrix 14	Protease	0.198
	MAP quinase p38 alfa	Quinase	0.160
Patulitrina	Xantina desidrogenase	Oxidoreductase	0.206
	Aldose redutase	Enzima	0.163
	TNF- α	Proteína secretada	0.136
	Interleucina-2	Proteína secretada	0.136
	NADPH oxidase 4	Enzima	0.110
Canidina	Trombina	Protease	0.768
	LXR- α	Receptor nuclear	0.768
	Glioxalase I	Enzima	0.320

	Antígeno de diferenciação de linfócito CD38	Enzima	0.122
	NADPH oxidase 4	Enzima	0.106

* Probabilidade da molécula testada – assumida como bioativa – ter a proteína listada como alvo.

3.8 Docagem molecular dos compostos selecionados com Orai1

A análise de ligação molecular potencial foi realizada entre os ligantes e as proteínas Orai1, STIM1 e NFAT. A interação entre os compostos selecionados e as proteínas-alvo foi avaliada pela energia de ligação. Nenhum dos quatro compostos apresentou parâmetros de afinidade, RMSD, ou distância entre ligante e aminoácido satisfatórios em relação ao sítio de ativação do fator de transcrição NFAT (dados suplementares – Apêndice).

Os compostos mostraram afinidades diferentes para Orai1, em seu sítio de ativação/regulação pela proteína STIM1. O resultado de acoplamento mostrou que cianidina pode ter a maior atividade de ligação a Orai1, com energia estimada de -8,3 Kcal/mol, com possível ligação em Phe171, Leu266 e Leu286 (Tabela 7, Figura 3D). A patulitrina pode se ligar a Orai1 com energia de acoplamento estimada de -7,0 Kcal/mol, com local de ligação em Ala282 e Pro288 (Tabela 7, Figura 3C). Como mostrado na tabela 7 e Figura 3A, o resultado simulado mostrou que a procianidina C1 apresenta potencial de ligação a Orai1 com uma energia de acoplamento de -5,8 Kcal/mol, com locais de ligação em Val285, Ala278, Ile263 e Val289. O acoplamento molecular da EGCdiG com o canal Orai1 mostrou que esse composto tem potencial de ligação a Orai1 com uma energia de acoplamento de -5,2 kcal/mol, com locais de ligação em Ala282, Ile263 e Val289 (Tabela 7, Figura 3B).

Tabela 7. Score da docagem molecular, sítios de ligação, distâncias das pontes de hidrogênio e constantes de inibição das interações dos compostos selecionados com a proteína Orai1 da via de ativação de linfócitos T.

Compostos	Afinidade de ligação (ΔG), Kcal/mol	Aminoácidos formando pontes de H com os compostos testados (distância das pontes de H, Å)	RMSD	Poses
Procianidina C1	-5,8	Val285 (3.1Å), Ala278 (3.5Å), Ile263 (4.2Å), Val289 (4.7Å)	0,0	10
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	-5,2	Ala282 (3.4Å), Ile263 (4.0Å), Val289 (4.4Å)	1,691	10
Patulitrina	-7,0	Ala282 (3.7Å), Pro288 (5.2Å)	0,984	10
Cianidina	-8,3	Phe171 (3.4Å), Leu266 (4.1Å), Leu286 (5.4Å)	0,548	10

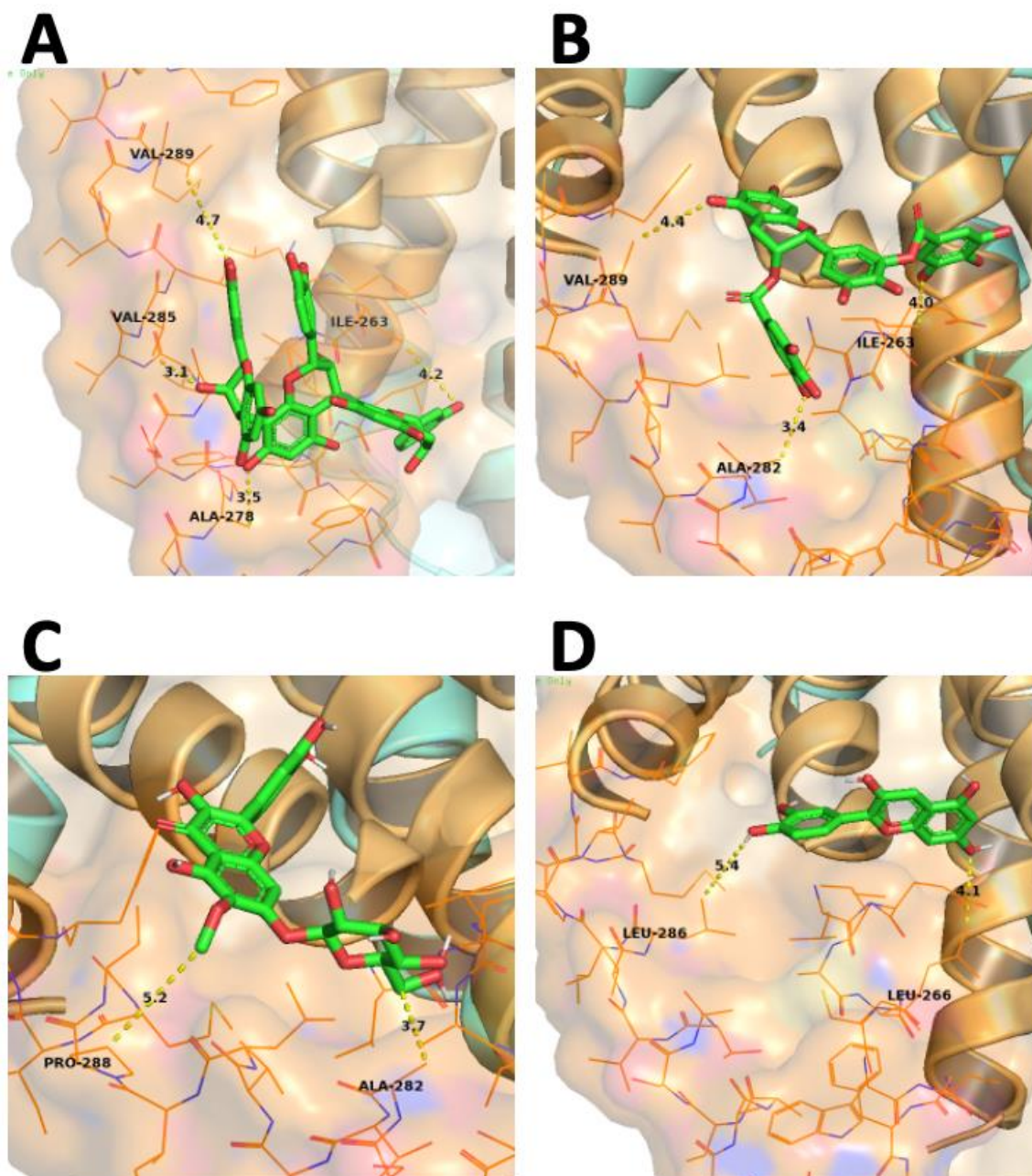


Figura 3. A análise de docking molecular dos compostos selecionados do extrato de *E. oleracea* Mart com o canal de cálcio Orai1. Predição de interação dos ligantes procianidina C1 (A), Epigallocatequina-di-Galato (B), patulitrina (C) e cianidina (D) com o sítio de ativação/regulação de Orai1 dependente de STIM1. Painéis com as interações com resíduos de aminoácidos da proteína Orai1. O software AutoDock Vina 4.2 foi utilizado combinando a definição de um campo de força de energia livre empírico com um Algoritmo Genético Lamarckiano, fornecendo previsão das conformações ligadas com energias livres de associação previstas.

Assim como para Orai1, os compostos selecionados apresentaram afinidades distintas para o sítio de ativação/regulação da proteína STIM1. O melhor resultado de acoplamento em relação à afinidade de ligação a STIM1 foi do composto EGCdiG, com

energia estimada de -7,0 Kcal/mol, com possível ligação em Ser29, Arg97 e Arg25 (Tabela 8, Figura 4B). A cianidina pode se ligar a STIM1 com energia de acoplamento estimada de -6,0 Kcal/mol, com local de ligação em Asp32, Gln28 e Gly22 (Tabela 8, Figura 4D). Como mostrado na tabela 8 e Figura 4C, o resultado simulado mostrou que a patulitrina apresenta potencial de ligação a Orail1 com uma energia de acoplamento de -5,5 Kcal/mol, com locais de ligação em Gly22 e Ala26. O acoplamento molecular da procianidina C1 com o regulador do canal Orail1, mostrou que esse composto tem potencial de ligação a STIM1 com uma energia de acoplamento de -4,2 Kcal/mol, com locais de ligação em Arg36, Leu100, Lys18 e Ala99 (Tabela 8, Figura 4A).

Tabela 8. Score da docagem molecular, sítios de ligação, distâncias das pontes de hidrogênio e constantes de inibição das interações dos compostos selecionados com a proteína STIM1 da via de ativação de linfócitos T.

Compostos	Afinidade de ligação (ΔG), Kcal/mol	Aminoácidos formando pontes de H com os compostos testados (distância das pontes de H, Å)	RMSD	Poses
Procianidina C1	-4.2	Arg36 (1.3Å), Leu100 (2.7Å), Lys18 (3.1Å), Ala99 (3.4Å)	0.001	10
Epigallocatequina-3,3-di-O-galato	-7.0	Ser29 (2.4Å), Arg97 (3.4Å), Arg25 (3.8Å)	1.751	10
Patulitrina	-5.5	Gly22 (3.6Å), Ala26 (3.8Å)	0.0	10
Cianidina	-6.0	Asp32 (2.2Å), Gln28 (3.0Å), Gly22 (3.3Å)	0.0	10

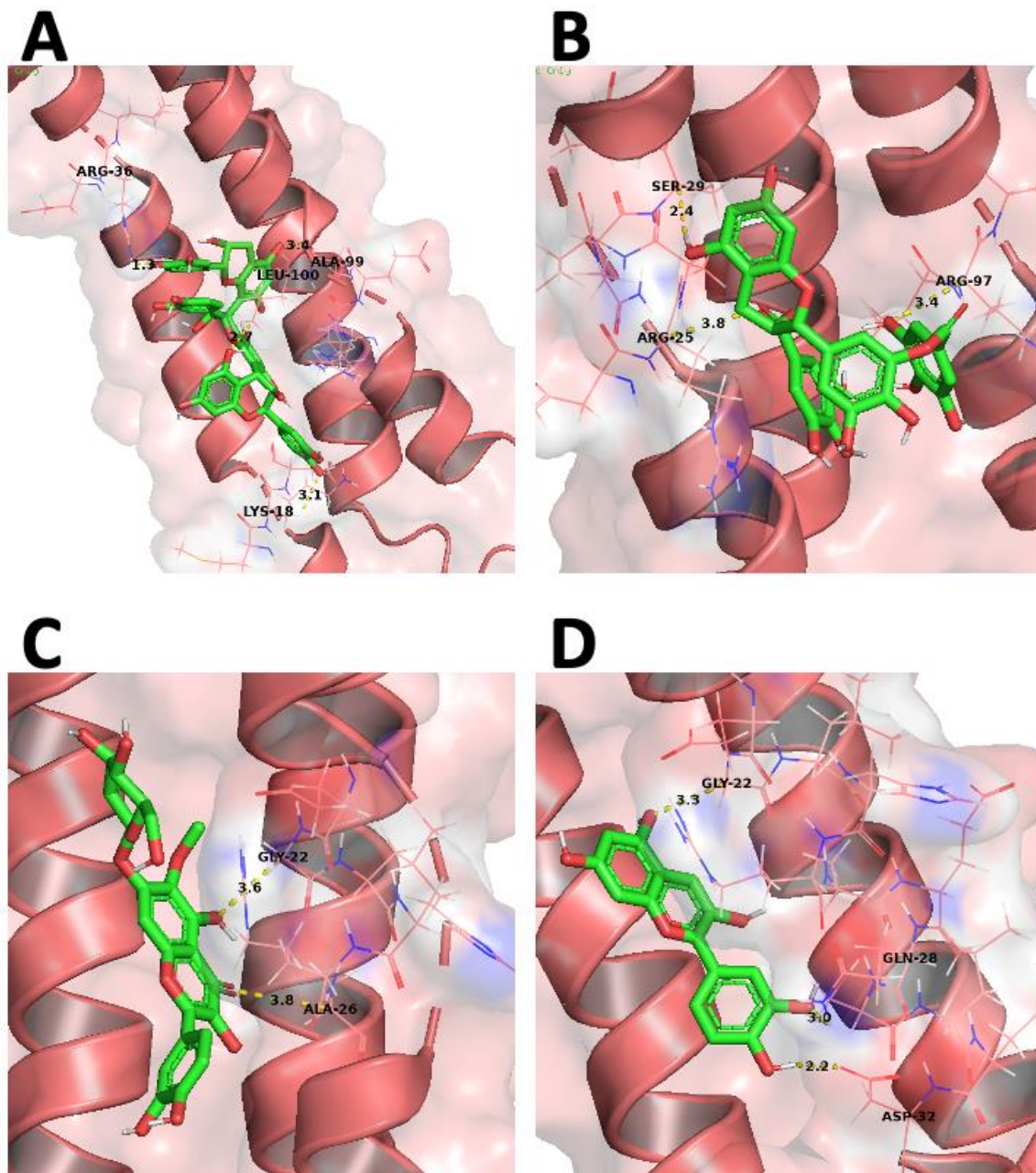


Figura 4. A análise de docking molecular dos compostos selecionados do extrato de *E. oleracea* Mart com a proteína STIM1. Predição de interação dos ligantes procianidina C1 (A), Epigallocatequina-di-Galato (B), patulitrina (C) e cianidina (D) com o sítio de ativação de STIM1. Painéis com as interações com resíduos de aminoácidos da proteína Orai1. O software AutoDock Vina 4.2 foi utilizado combinando a definição de um campo de força de energia livre empírico com um Algoritmo Genético Lamarckiano, fornecendo previsão das conformações ligadas com energias livres de associação previstas.

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos por meio de análise computacional o potencial dos compostos isolados dos extratos da semente e polpa de açaí na ativação de linfócitos T, especificamente sobre a via das proteínas Orai1/STIM1/NFAT. As substâncias selecionadas, com base na sua concentração nos extratos e estudos anteriores, foram PCC1, EGCdiG, PAT e CY. Dentre as ações previamente descritas na literatura, a atividade antioxidante e o potencial biológico pelas nossas análises foram confirmadas. Os estudos anteriores abordaram o extrato bruto ou frações, contendo diferentes metabólitos, não levando em consideração os compostos isolados.

Os resultados apresentados nesse trabalho ratificam a relevância do uso dos métodos computacionais como uma forma prática, rápida e produtiva da pesquisa em produtos naturais. Nesse contexto, os componentes da polpa e semente do açaí avaliados, particularmente a cianidina e patulitrina, demonstraram características físico-químicas, potencial de absorção no trato digestivo e pele, baixa toxicidade e ligação possível em sítios reguladores das proteínas da via Orai1/STIM1/NFAT. de ativação de linfócitos T.

A fração extraída da polpa é rica em antocianinas, como a cianidina, também apresenta em sua composição um acentuado valor energético devido conter lipídeos, como ômega 6 e 9, fibras, vitamina E, proteínas e minerais (MACHADO et al, 2016). A semente do açaí pode ser considerada fonte de recursos naturais antioxidantes por apresentar em sua composição proantocianidinas e catequinas (DE MORAES et al, 2022).

Essas moléculas bioativas encontradas no açaí possuem efeito analgésico, antioxidante e neuroprotetor, que são capazes de interagir positivamente com células do metabolismo celular oxidativo, atuando no sistema imunológico, em doenças como câncer, dislipidemias e envelhecimento por meio dos radicais livres, devido à alta atividade antioxidante encontrada nessas moléculas (MACHADO et al, 2019).

Os compostos majoritários cianidina e a patulitrina se destacaram nessa pesquisa por suas características físico-químicas, demonstrando a melhor estimativa na biodisponibilidade oral desses compostos. Ainda, sugere-se que o consumo da polpa do açaí está associado ao efeito antioxidante, além dos diversos benefícios devido a rica composição em flavonoides e compostos fenólicos, como também contribui com a melhora da resposta no processo oxidativo no interior da célula (DA SILVA et al, 2020; FERNANDES et al, 2021).

Elucidando os efeitos farmacológicos em uma abordagem *in silico* com diferentes tipos de flavonoides, foi verificado que os compostos catequina e epicatequina apresentaram a melhor biodisponibilidade oral entre os grupos, ainda com suas propriedades farmacocinéticas promissoras, como também o potencial de alta absorção oral através das plataformas computacionais de acordo com a regra dos cinco de Lipinski (DE OLIVEIRA et al, 2021).

Nesse contexto, a literatura traz estudos que mostram efeitos no sistema imunológico promissores. Ao encontro disso, foi demonstrado que os flavonoides estão diretamente ligados ao comportamento de linfócitos T, na liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias durante a inflamação crônica, por vez também reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias na circulação humana, incluindo TNF α e IL-6 (FORD et al, 2016).

A exemplo disso, os efeitos já são conhecidos como atividade imunomoduladora, por sua capacidade de modular a resposta imune, embora os mecanismos moleculares envolvidos não sejam bem compreendidos, no entanto, o estudo de revisão sobre seus efeitos no sistema imunológico sugere que estes suprimem a via imunológica PI3k / AKT / mTOR, causando a indução de células reguladoras e a diferenciação do linfócito T efetor (HOSSEINZADE et al., 2019; NAKAMOTO et al., 2019).

Ainda, na análise *in silico* de semelhança com drogas os derivados das antocianidinas mostraram parâmetros de potencial biodisponibilidade oral pela regra dos cinco de Lipinski (2004) e as variações de Ghose (KURTER et al, 2022). Em nosso trabalho a biodisponibilidade oral dos compostos foi comprovada com destaque para a cianidina e a patulitrina, ambos se enquadram na regra dos 5 de Lipinski. A administração via oral de medicamentos oferece várias vantagens, incluindo conveniência, menor desconforto para o paciente, fácil autogestão, potencial redução de custos, e pode ser adequada para medicamentos de longa duração (POONGAVANAM et al, 2018).

PM abaixo de 500g/mol assegura uma boa solubilidade em água. Os compostos CY e PAT apresentaram o PM ideal. O TPSA (Área de Superfície Polar Topológica) menor que 140 indica uma boa permeabilidade da molécula na membrana plasmática celular, e apenas a cianidina apresentou resultados dentro desse parâmetro. O Log P menor que 5 confirma a lipofilicidade de uma molécula, e os números aceptores e doadores de hidrogênio dentro dos padrões estão relacionados a permeabilidade intestinal dos compostos. Levando em consideração esses critérios na análise de biodisponibilidade

radar (LIPO, FLEX, SIZE, POLAR, INSOLU, INSATU), os compostos mostraram-se promissores para alguma via de administração.

Um estudo recente de ZARRICUETA et al. (2022) revelou que o cloreto de cianidina tem efeito gastroprotetor em diferentes concentrações no modelo experimental de úlcera gástrica induzida *in vivo*. Além disso, demonstrou que a dose efetiva varia de acordo com o sexo, mesmo em um mesmo modelo experimental. A partir disso, a avaliação do comportamento farmacocinético dos compostos selecionados em nosso estudo demonstrou que a CY obteve o melhor resultado para o potencial de absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), substrato da glicoproteína P, penetração pela pele (log Kp) e inibição da CYP1C2. Os demais compostos, PCC1, EGCdiG e PAT mostraram resultados expressivos apenas em relação a (BAIXA) absorção pelo TGI.

Em ambas as análises os compostos não apresentaram potencial de atravessar a barreira hematoencefálica, sugerindo não apresentarem efeitos indesejados no sistema nervoso central. A previsão de uma adequada permeação pela pele (log Kp) indicou que os compostos podem ser utilizados de forma tópica no controle de infecções cutâneas e manifestações inflamatórias crônicas, como em casos de psoríase. Além disso, o estudo também destacou a influência dos compostos analisados sobre substratos da glicoproteína P, uma substância relacionada à resistência dos fármacos no organismo. Adicionalmente, houve observação de inibição da isoenzima CYP1C2 do citocromo P450. É importante ressaltar que o citocromo P450 desempenha um papel crucial no metabolismo de medicamentos, com suas diversas enzimas interagindo de forma complexa. Diversos medicamentos afetam a família de isoenzimas do CYP450, sendo notáveis as contribuições frequentes das enzimas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4 para o metabolismo da maioria dos medicamentos (DOLIGALSKI et al., 2012; MANIKANDAN et al., 2018).

A avaliação da toxicidade desempenha um papel essencial na condução de pesquisas no desenvolvimento de fármacos, uma vez que a realização de ensaios de carcinogenicidade e mutagenicidade é fundamental para determinar o potencial tóxico de moléculas em animais e seres humanos (LU et al, 2017). Aproximadamente 40% das falhas relacionadas aos fármacos podem ser atribuídas ao nível de toxicidade, por isso é essa análise é fundamental na fase inicial de pesquisa para evitar resultados insatisfatórios e gastos desnecessários (ALQAHTANI et al, 2017). Nossa pesquisa demonstrou resultados favoráveis ao avaliar a hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade dos compostos investigados. Notavelmente,

identificamos uma probabilidade de efeitos tóxicos inferior a 1% para todos esses compostos, sugerindo um perfil de segurança promissor em relação a essas considerações. Entretanto, três compostos foram considerados tóxicos em sua a predição, como a imunotoxicidade para PCC1, PAT e a CY com efeito carcinogênico.

A partir desses dados obtidos, a imunotoxicidade foi considerada uma predição ativa para PCC1 0,91% e PAT 0,98% expressos como probabilidade. Sendo assim, esses dados podem significar um resultado positivo sobre a estimulação do sistema imunológico quando apresenta essa atividade, que por sua vez, é satisfatório pensar sobre o aumento expressivo na resposta proliferativa dos linfócitos T. Ainda, os outros compostos apresentaram características diferentes de predição sendo considerado inativo para a EGCdiG 0,59% e CY 0,93%.

A avaliação no PASS Online ultrapassa a predição de outros métodos desenvolvidos para caracterizar as atividades biológicas em pesquisa científica (DEMBITSKY et al, 2021). Baseado em publicações, nos últimos quinze anos o programa tem sido utilizado para revelar o potencial farmacológico de substâncias naturais (LAGUNIN et al, 2020). Os compostos majoritários da semente e polpa do açaí selecionados apresentaram um acentuado número de efeitos biológicos que possuem grande probabilidade de serem concretas. Alguns dos compostos apresentaram probabilidade de quase 100% de causar determinado efeito experimentalmente, como atividade antioxidante (PCC1, EGCdiG e PAT) e a CY como possível atividade para agonista de integridade de membrana, ainda o pi mostrou-se com menos de 1% de chances de não serem ativos para ambos os compostos.

Todavia, é importante ressaltar que esses resultados são baseados em probabilidades estatísticas, em que as estruturas das moléculas dos compostos analisados foram comparadas a um banco de dados com moléculas que já possuem efeitos experimentalmente comprovados em trabalhos científicos. Dessa forma, o requisito fundamental para todas as análises deste estudo é a fórmula estrutural dos compostos e a de seus possíveis alvos de interação.

Os fármacos podem ser classificados, estruturalmente inespecíficos, que dependem exclusivamente das suas características físico-químicas para realizarem seus efeitos farmacológicos, e os estruturalmente específicos, que para exercerem seus efeitos biológicos precisam se ligar seletivamente a uma biomacromolécula-alvo, como exemplo os alvos identificados nesta etapa (MAEDA et al, 2021). A partir disso, a interação entre os compostos fitoquímicos permitiu identificar onde as atividades biológicas dos

compostos agem no organismo, e combinando esses ensaios pode-se atestar a eficácia dos compostos protótipos, e afirmá-los como estruturalmente específicos, pois suas respostas farmacêuticas dependem da interação deles com o alvo.

Nesse sentido, simulamos o acoplamento molecular dos quatro compostos para prever sua capacidade de ligação às proteínas Orai1, STIM1 e NFAT. A interação entre a CY e a PAT com aminoácidos do sítio de regulação/ativação da Orai1, e da EGCdiG e a CY ao sítio ativador de STIM1 sugerem que, entre os quatro compostos, a energia necessária para a ligação entre a cianidina e proteínas-alvo foi a mais baixa, seguida pela PAT e EGCdiG. Essas descobertas têm implicações significativas na possível modulação das respostas imunológicas pelos compostos estudados. A afinidade observada entre a CY e a PAT com os aminoácidos nos sítios de regulação/ativação da Orai1, bem como a interação da EGCdiG e CY com o sítio ativador de STIM1, sugere que esses compostos podem influenciar diretamente a ativação das proteínas Orai1 e STIM1. Dado que a ativação dos linfócitos T desempenha um papel central nas respostas imunológicas, as interações observadas entre esses compostos e as proteínas-alvo podem impactar a regulação das respostas do sistema imunológico.

Diante destes resultados novos estudos experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são necessários para confirmação do potencial desses compostos no desenvolvimento de alternativas terapêuticas para doenças inflamatórias e autoimunes, além de fornecer novas perspectivas para o uso de produtos naturais como fonte de compostos bioativos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa oferecem insights valiosos sobre as atividades dos compostos majoritários da semente e polpa de *Euterpe oleracea* Mart relacionados às respostas imunológicas. Os dados fornecem a fundamentação para futuros estudos envolvendo o desenvolvimento de candidatos a fármacos e a realização de testes biológicos *in vitro* e *in vivo* para modulação da resposta dos linfócitos T. Todos os compostos exibiram propriedades físico-químicas relevantes, indicando promissoras vias de administração na análise de biodisponibilidade radar. Mesmo que a procianidina C1 e a EGCdiG não tenham demonstrado boa de disponibilidade oral teórica, a patulitrina e a cianidina foram aprovadas em todos os modelos de avaliação testados.

Além disso, os compostos mostraram potencial para absorção no trato gastrointestinal, penetração cutânea e interações com a CYP1A2. Eles também apresentaram baixo potencial tóxico e diversas atividades biológicas potenciais, indicando alvos moleculares relacionados aos espectros previstos. Por fim, a docagem molecular demonstrou a interação dos compostos selecionados com os sítios de ativação/regulação das proteínas Orai1 e STIM1, essenciais para a ativação dos linfócitos T.

Estes resultados sugerem que os compostos selecionados podem avançar com segurança para análises e validações adicionais de suas atividades no sistema imunológico, promovendo o desenvolvimento de novos fármacos para a regulação das respostas imunológicas em infecções e processos inflamatórios crônicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório LPI– UFMA; LIF e ao Laboratório de Química de Produtos Naturais – UFMA.

Conflito de interesse

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar que sejam relevantes ao conteúdo deste artigo.

REFERÊNCIAS

ALQAHTANI S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017.

BAI X, Jiang M, Wang J, Yang S, Liu Z, Zhang H, Zhu X. Cyanidin attenuates the apoptosis of rat nucleus pulposus cells and the degeneration of intervertebral disc via the JAK2/STAT3 signal pathway *in vitro* and *in vivo*. **Pharm Biol.** Dec;60(1):427-436, 2022.

BANERJEE P., Eckert O.A., Schrey A.K., Preissner R.: ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Res** (Web server issue 2018).

BENET, Leslie Z. et al. BDDCS, a Regra dos 5 e a drogabilidade. **Revisões avançadas de entrega de medicamentos**, v. 101, p. 89-98, 2016.

BERNARDI, F. M et al. O método estudo de caso aliado à temática fármacos no ensino de química orgânica no nível superior. 2022.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W357-W364, 2019.

DA SILVA AS, Nunes DVQ, Carvalho LCDRM, Santos IB, de Menezes MP, de Bem GF, Costa CAD, Moura RS, Resende AC, Ognibene DT. Açai (*Euterpe oleracea* Mart) seed extract protects against maternal vascular dysfunction, hypertension, and fetal growth restriction in experimental preeclampsia. **Hypertens Pregnancy.** 2020.

DEMBITSKY VM. In Silico Prediction of Steroids and Triterpenoids as Potential Regulators of Lipid Metabolism. **Mar Drugs.** 2021.

DELANO, Warren L. et al. Pymol: uma ferramenta gráfica molecular de código aberto. **Notícias CCP4 I. Cristalografia de Proteínas.**

DE ALMEIDA, Juliane Rosalia et al. O enfermeiro frente às práticas integrativas e complementares em saúde na estratégia de saúde da família. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 18, p. e77-e77, 2019.

DE MORAES et al. Açai seed extract (ASE) rich in proanthocyanidins improves cardiovascular remodeling by increasing antioxidant response in obese high-fat diet-fed mice. *Chem Biol Interact.* 2022

DE OLIVEIRA NKS, Almeida MRS, Pontes FMM, Barcelos MP, Silva GM, de Paula da Silva CHT, Cruz RAS, da Silva Hage-Melim LI. Molecular Docking, Physicochemical Properties, Pharmacokinetics and Toxicity of Flavonoids Present in *Euterpe oleracea* Martius. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2021.

DONG C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2021.

DOLIGALSKI, CT, Logan AT, Silverman A. Drug interactions: a primer for the gastroenterologist. *Gastroenterol Hepatol* 2012; 8(6): 373-383.

DORNELES, Bethina Luiz et al. Predição de espectro de atividades biológicas da matriz química do açaí (*euterpe oleracea* mart.). **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 22, n. 1, p. 391-404, 2021.

FERNANDES MS, Machado AK, Assmann CE, Andrade EN, Azzolin VF, Duarte MMMF, Prado-Lima PASD, Riffel RT, Maia-Ribeiro EA, Cadoná FC, Praia R, Barbisan F, Cruz IBMD. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) reduces the inflammatory response triggered in vitro by the antipsychotic drug olanzapine in RAW 264.7 macrophage cells. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2021.

FILIMONOV, Dmitrii et al. Avaliação de similaridade química através de vizinhanças multiníveis de átomos: definição e comparação com os demais descritores. **Revista de informação química e ciências da computação**. v. 39, n. 4, pág. 666-670, 1999.

FORD CT, Richardson S, McArdle F, Lotito SB, Crozier A, McArdle A, Jackson MJ. Identification of (poly)phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. *Br J Nutr.* 2016.

HOSSEINZADE A, Sadeghi O, Naghdipour Biregani A, Soukhtehzari S, Brandt GS, Esmailzadeh A. Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Front Immunol.* 2019.

JOHANSSON, Maria U. et al. Definição e busca de motivos estruturais usando DeepView/Swiss-PdbViewer. **Bioinformática BMC**, v. 13, p. 1-11, 2012.

KURTER H, Mert-Ozupek N, Ellidokuz H, Calibasi-Kocal G. In-silico drug-likeness analysis, ADME properties, and molecular docking studies of cyanidin-3-arabinoside, pelargonidin-3-glucoside, and peonidin-3-arabinoside as natural anticancer compounds against acting receptor-like kinase 5 receptor. **Anticancer Drugs**. Jul 1;33, 2022.

LAGUNIN, Alexey et al. Modelagem QSAR de toxicidade aguda em ratos com base na previsão PASS. **Informática molecular**, v. 30, n. 2-3, pág. 241-250, 2011.

LAGUNIN, A.; Povydysh, M.; Ivkin, D.; Luzhanin, V.; Krasnova, M. Ação anti-hipóxica de culturas celulares de *Panax japonicus*, *Tribulus terrestris* e *Dioscorea deltoidea*: estudos in silico e em animais. **Mol. Informar**. 2020.

LIANG X, Zhu W, Lv Z, Zou Q. *Molecular Computing and Bioinformatics*. **Molecules**. 2019.

LU J, Zhang P, Zou X, et al. In silico prediction of chemical toxicity profile using local lazy learning. **Comb Chem High Throughput Screen**. 2017.

MACHADO, A. K. et al. Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016.

MACHADO, A. K. et al. Upstream pathways controlling mitochondrial function in major psychosis: a focus on bipolar disorder. **The Canadian Journal of Psychiatry**. v. 61, p. 446-456, 2016.

MACHADO, A. K. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) has anti-inflammatory potential through NLRP3-inflammasome modulation. **Journal of Functional Foods**. v. 56, p. 364-371, 2019.

MAEDA K, Hisaka A, Ito K, Ohno Y, Ishiguro A, Sato R, Nagai N. Classification of drugs for evaluating drug interaction in drug development and clinical management. **Drug Metab Pharmacokinet**. 2021.

MANIKANDAN P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Curr Drug Targets**. 2018.

MARQUES ES, Tsuboy MSF, Carvalho JCT, Rosa PCP, Perazzo FF, Gaivão IOM, Maistro EL. First cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic assessment of Euterpe oleracea fruit oil (açai) in cultured human cells. *Genet Mol Res.*, 2017.

NAKAMOTO A, Mitani M, Urayama K, Maki A, Nakamoto M, Shuto E, Nii Y, Sakai T. Nobiletin Enhances Induction of Antigen-Specific Immune Responses in BALB/c Mice Immunized with Ovalbumin. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2019.

PARK YJ, Yoo SA, Kim M, Kim WU. The Role of Calcium-Calcineurin-NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2020.

PERINI J, Machado DE, Palmero CY, Claudino MC, de Moura RS, Palumbo Junior A, Perini JA, Nasciutti LE. Euterpe oleracea extract (açai) exhibits cardioprotective effects after chemotherapy treatment in a breast cancer model. *BMC Complement Med Ther*. 2023.

POONGAVANAM V, Doak BC, Kihlberg J. Opportunities and guidelines for discovery of orally absorbed drugs in beyond rule of 5 space. *Curr Opin Chem Biol*. 2018.

PUCK JM. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia. *Immunol Rev*. Jan;287(1):241-252. 2019.

RUIZ-CARMONA, S., Alvarez-Garcia, D., Foloppe, N., Garmendia-Doval, A. B., Juhos, S., Schmidtke, P., Barril, X., Hubbard, R. E., & Morley, S. D. rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids. *PLoS computational biology*, 10(4), 2014.

SUN XL, Xiang ZM, Xie YR, Zhang N, Wang LX, Wu YL, Zhang DY, Wang XJ, Sheng J, Zi CT. Dimeric(-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation of lung cancer cells by inhibiting the EGFR signaling pathway. *Chem Biol Interact*. Aug 12. 2022.

VAETH M, Kahlfuss S, Feske S. CRAC Channels and Calcium Signaling in T Cell-Mediated Immunity. *Trends Immunol*. 2020 Oct;41(10):878-901. doi: 10.1016/j.it.2020.06.012. Epub 2020.

VILLALÁIN J. Procyanidin C1 Location, Interaction, and Aggregation in Two Complex Biomembranes. *Membranes* (Basel). Jul 5;12(7):692. 2022.

ZARRICUETA ML, Fagundes FL, Pereira QC, Pantaleão SQ, Santos RCD. Relationship between Hormonal Modulation and Gastroprotective Activity of Malvidin and Cyanidin Chloride: In Vivo and In Silico Approach. **Pharmaceutics**. 2022 Mar 4;14(3):565. 2022.

ZHANG X, Wu F, Yang N, Zhan X, Liao J, Mai S, Huang Z. In silico Methods for Identification of Potential Therapeutic Targets. **Interdiscip Sci**. 14(2):285-310, 2022.

ZHOU, S.; Zhou, Z.; Ding, K.; Yuan, Y.; Loftin, C.; Zheng, F.; Zhan, C.-G. DREAM-in-CDM approach and identification of a new generation of anti-inflammatory drugs targeting mPGES-1. *Sci. Rep.*, 10, 10187. 2020.

YASUKAWA K, Kasahara Y. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model. **Int J Inflamm**. 2013.

WEIDINGER C, Shaw PJ, Feske S. STIM1 and STIM2-mediated Ca (2+) influx regulates antitumour immunity by CD8(+) T cells. **EMBO Mol Med**. 2013 Sep;5(9):1311-21. 2013.

WIK JA, Skålhegg BS. T Cell Metabolism in Infection. **Front Immunol**. Mar. 2022.

ANEXOS



ANEXO 1 – SUBMISSÃO DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Natural Products and Bioprospecting

New Insights into T Lymphocyte Activation by Metabolites from *Euterpe oleracea* Mart: An in silico Assessment of the ORAI1/STIM1/NFAT Pathway --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	NPAB-D-23-00511	
Full Title:	New Insights into T Lymphocyte Activation by Metabolites from <i>Euterpe oleracea</i> Mart: An in silico Assessment of the ORAI1/STIM1/NFAT Pathway	
Article Type:	Original Article	
Corresponding Author:	PAULO VITOR SOEIRO-PEREIRA, Ph.D. Federal University of Maranhao: Universidade Federal do Maranhao São Luís, MA BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Maranhao: Universidade Federal do Maranhao	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Nágila Caroline Fialho Sousa, B.Sc.	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Nágila Caroline Fialho Sousa, B.Sc. Dayanne Silva Freitas, Ph.D. Nayna Sabrina Vieira, B.Sc. Kelly Portela Sousa, M.Sc. Angela Falcai, Ph.D. Cláudia Quintino Rocha, Ph.D. Lucilene Amorim Silva, Ph.D. PAULO VITOR SOEIRO-PEREIRA, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES — process 88881.130813/2016-01 — FINANCE CODE 001)	Not applicable
Abstract:	<p>The Amazonian <i>Euterpe oleracea</i> Mart, commonly known as açai, is renowned for its nutritional properties and antioxidant, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities. However, a comprehensive understanding of how its components affect the immune system is still lacking. In this study, we conducted in silico investigations into the potential of four primary secondary metabolites extracted from açai seeds and pulp — procyanidin C1 (PCC1), epigallocatechin-3,3-diO-gallate (EGCdiG), patulintrine (PAT), and cyanidin (CY) — on the ORAI1/STIM1/NFAT pathway for T-cell activation. All evaluated compounds exhibited relevant physicochemical properties, showing promise for various administration routes in radar bioavailability analysis. Notably, CY and PAT displayed the best oral bioavailability profiles based on pharmacokinetic parameters, indicating potential for absorption within the gastrointestinal tract and skin penetration. PASS predictions of biological activity spectra revealed that all compounds have potential for various activities, including peroxidase inhibition, free radical scavenging, antioxidant effects, and regulation of the immuneinflammatory response. Moreover, CY and PAT exhibited low toxic potential in hepatotoxicity, cytotoxicity, and mutagenicity. Molecular docking analysis demonstrated that CY (-7.0 kcal/mol) and PAT (-8.3 kcal/mol) bind to the ORAI1 regulatory site (Ala282 and Phe171, respectively), while EGCdiG (-7.0 kcal/mol) and CY (-6.0 kcal/mol) exhibited affinity for the STIM1 activation/regulatory site (Gly22 and Asp32, respectively). Our study</p>	

	proposes the evaluation of cyanidin and patulitrine as modulators of T-cell responses due to their potential modulation of the ORAI1/STIM1 pathway.
Suggested Reviewers:	Vanderlan da Silva Bolzani UNESP: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho vanderlan.bolzani@unesp.br
	Clara Bik San Lau The Chinese University of Hong Kong claralau@cuhk.edu.hk
	Rachel Mata Universidad Nacional Autonoma de Mexico rachel@unam.mx
Opposed Reviewers:	