

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade De Farmácia**  
**Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas**

Francisca Janekely Buriti

**TRIAGEM ANTIVIRAL DE ESPÉCIES VEGETAIS FRENTE AO CORONAVÍRUS  
MHV-3 E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Terminalia phaeocarpa* EICHLER**

Belo Horizonte

2025

Francisca Janekely Buriti

**TRIAGEM ANTIVIRAL DE ESPÉCIES VEGETAIS FRENTE AO CORONAVÍRUS  
MHV-3 E ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Terminalia phaeocarpa* EICHLER**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito necessário à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:**

Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG

**Coorientadores:**

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana,  
FAFAR, UFMG

Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua, FAFAR, UFMG

Belo Horizonte

2025

B958t Burity, Francisca Janekely.  
Triagem antiviral de espécies vegetais frente ao coronavírus MHV-3 e estudo fitoquímico de *Terminalia phaeocarpa* EICHLER [recurso eletrônico] / Francisca Janekely Burity. – 2025.  
1 recurso eletrônico (236 f. : il.) : pdf

Orientador: Fernão Castro Braga.  
Coorientadores: Priscilla Rodrigues Valadares Campana.  
Rodrigo Maia de Pádua.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Vírus da Hepatite Murina – Teses. 2. SARS-CoV-2 – Teses. 3. Terminalia – Teses. 4. Flavonoides – Teses. 5. Triterpenos – Teses. 6. Extratos vegetais – Teses. 7. Compostos fitoquímicos – Teses. 8. Antivirais – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. III. Pádua, Rodrigo Maia de. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

“TRIAGEM ANTIVIRAL DE ESPÉCIES VEGETAIS FRENTE AO CORONAVÍRUS MHV-3 E ESTUDO FITOQUÍMICO DE Terminalia phaeocarpa EICHLER”

**FRANCISCA JANEKELY BURITI**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. José Hugo de Sousa Gomes  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dr. Alisson Samuel Portes Caldeira  
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz

Profa. Dra. Vera Lúcia de Almeida  
Fundação Ezequiel Dias - Funed

Prof. Dr. Fernão Castro Braga - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Coorientadora  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua - Coorientador  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 14 de novembro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Maia de Padua, Professor do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernão Castro Braga, Professor do Magistério Superior**, em 14/11/2025, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Vera Lucia de Almeida, Usuário Externo**, em 14/11/2025, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **José Hugo de Sousa Gomes, Usuário Externo**, em 14/11/2025, às 17:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Alisson Samuel Portes Caldeira, Usuário Externo**, em 14/11/2025, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 20/11/2025, às 00:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4707164** e o código CRC **CD139A5D**.

---

## **DEDICATÓRIA**

**Aos braços que me acolhem,  
às vozes que me encorajam,  
aos corações que batem comigo:  
minha família.  
Esta vitória é nossa!**

## AGRADECIMENTOS

Que sejamos gratos.

Primeiramente, agradeço àquele que me concedeu a graça de chegar até aqui. Se concluo este doutorado, é porque Deus me sustentou em todos os momentos difíceis, fazendo-me enxergar que eu não estava sozinha, me concedendo uma força que vai além do explicável. “Foi por causa d'Ele que eu ainda não parei, nem desisti, foi por causa d'Ele que eu levantei e decidi seguir, e é por causa d'Ele que eu ainda continuo a lutar, por causa de Jesus, que sempre me conduz, eu sei que eu chego lá, porque quando eu não der conta Ele vai me ajudar”.

Agradeço imensamente aos meus pais, José e Antônia. Esse título é, antes de tudo, por vocês e para vocês. E, para que todos saibam: eu tenho a maior honra de chamá-los de meus pais, vocês são a minha maior referência de resiliência, valores e princípios, mesmo com pouco fizeram muito. É o povo do sítio virando doutor!

Ao meu irmão Janielson, que mesmo sentindo a minha ausência, me sustentou sempre com suas orações. E à minha cunhada, Nayelly, agradeço pelas conversas, risadas, pelos reels engraçados no Instagram e por todo o apoio e encorajamento.

Aos meus sobrinhos Eloah e Benício, meu próton e meu elétron: obrigada por todo amor genuíno. O amor e carinho de vocês foi minha âncora e me fizeram sair de processo profundamente tristes e difíceis. Este título é só o primeiro passo, uma pequena amostra do futuro que quero construir para vocês, em retribuição a todo o carinho e amor incondicional que me deram.

Aos meus pais espirituais, Eliene e Segundo, meu agradecimento por sempre estarem ao meu lado. Vocês caminharam comigo por toda a minha trajetória acadêmica – um longo caminho desde o ensino fundamental (rsrs) –, me apoiaram na minha vinda para BH, e me deram o dom da preocupação, da amizade e, principalmente, das orações.

Ao meu orientador, professor Fernão Braga, agradeço por ter confiado a mim a oportunidade de ser sua orientanda, mesmo sem me conhecer. Tive que aprender muitas coisas – algumas delas com 'puxões de orelha' –, mas que me fizeram crescer muito. O processo não foi fácil, as vezes regados a lágrimas, mas se hoje sou o que sou devo também ao senhor. Acredito estar bem melhor do que quando iniciei meu doutorado, e isso devo aos seus ensinamentos. O senhor é uma referência de comprometimento, inteligência e amor à pesquisa.

Aos meus coorientadores, professora Priscila Campana e professor Rodrigo Pádua, meus profundos agradecimentos. À professora Priscila agradeço por ser essa ‘mãezona’, carismática, solícita e, principalmente, humana. Seu coração é generoso e empático, tem a rara capacidade de sentir os nossos medos e por isso caminha junto conosco. Ao professor Rodrigo, por ser sempre solícito, por ser aquele professor que vai para a bancada, que faz junto, tira várias dúvidas, mas que também te questiona. Além disso, por ser brincalhão, amigo dos seus alunos, e o chefe das melhores gambiarras. Agradeço imensamente por tudo, vocês são o que almejo ser quando ‘crescer’.

Ao Professor Ricardo José, meu agradecimento por ser um mestre que vai além da técnica. O senhor não apenas me ensinou espectrometria e espectroscopia, mas o fez com tanta generosidade e empatia que tornou o caminho mais leve e claro. Obrigada por sua ajuda incansável e por compartilhar deste momento tão importante.

Aos meus amigos de laboratório, Patrícia, Gabriela, Laura, Rosa, Amanda, Wellerson, Tarciana, Diana, Larissa, Diego, José Hugo, Luís, Lorena, Vitor: com vocês os dias foram mais leves e sorridentes. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Levarei os nossos momentos juntos para minha vida e quando tiver filhos contarei a eles sobre vocês.

Dos amigos do laboratório, quero abrir um parágrafo para agradecer em especial à Patrícia Gardênia. Ela foi minha companheira e confidente, sempre presente com conselhos sábios. Esteve ao meu lado nos momentos difíceis, nas minhas crises de ansiedade e nas inúmeras vezes que pensei em desistir. Esteve também nos momentos bons de alegria e descontração, celebrou comigo os momentos felizes, as vezes estava tão cansada que não queria rrs, mas ela nunca deixou passar sem comemoração, obrigada por tudo!

Agradeço aos técnicos do laboratório de fitoquímica, Werônica, Luciene, Bárbara, e em especial a Juliana Raposo, André Hilário e a Raquel. À Ju, obrigada pelos ensinamentos, obrigada por ter pego minha mão em um dos momentos mais difíceis do meu doutorado e ter me ajudado a entender um pouco mais de cromatografia gasosa, obrigada pelos materiais, apostilas, e principalmente pela amizade, pelas risadas, conversas e pelos momentos de relaxamento com óleos essenciais. Ao André, obrigada pelo carinho, abraços de conforto, pelos cafés que não tomo, mas amava sentir o aroma e pelas palavras de apoio. À Raquel, pela atenção e pelo carinho no início do meu doutorado — pelos lanches que preparava e deixava para mim nas noites em que eu ficava até tarde no laboratório, e por sempre me acolher carinhosamente como sua “filha nordestina” — meu sincero agradecimento.

Agradeço imensamente ao amigo/irmão Leonardo Fideles, por ter um coração tão lindo e generoso. Amigo, sem a sua amizade tudo teria sido mais difícil. Obrigada pelo cuidado nas vezes em que fiquei doente, obrigada por tantas vezes me assegurar que tudo daria certo e por ter feito meus dias mais leves.

Agradeço à minha amiga/irmã Rayane Novais, pelas conversas, pelo companheirismo, por ser minha confidente. Obrigada por sofrer junto comigo as minhas dores e meus medos, por assistir as minhas várias prévias, mesmo sem entender nada, por me chamar para morar junto no seu apê, quando eu estava sem cabeça nenhuma para procurar uma casa para morar por que estava preste a qualificar. Obrigada por ter sido minha irmã mais nova.

Agradeço também a Dona Graça e seu Assunção, tios da Rayane, sempre tão solícitos e graciosos. Sei que, se eu precisasse de qualquer coisa, poderia contar com vocês. Obrigada por tudo!

Meus agradecimentos à Isabella Aurora e sua família, pelo acolhimento, pela amizade e pelas aventuras nas trilhas até as cachoeiras. Obrigada por me proporcionarem conhecer um pouco mais das belezas de Minas Gerais.

Agradeço aos meus colegas da Vila, Juan e Gabriela, que, quando eu estava imersa em três mil tubos de penicilina fazendo coluna aberta, vieram para o laboratório pesar frascos e lavar tubinhos. O coração de vocês é lindo! Muito obrigada.

Agradeço às meninas da natação, como carinhosamente as chamo – Tayná, Yasmim, Julia, Rana e Vanessa – obrigada pelo carinho, pelas altas risadas na piscina e, principalmente, no vestuário. Meus intervalos de almoço foram mais felizes com vocês.

Agradeço a minha IC de coração, Izabel Cerqueira, por ter me ajudado mesmo não sendo minha IC oficialmente, pela amizade e abraços apertados que quase quebravam minhas costelas.

Agradeço de coração aos irmãos da Igreja em Belo Horizonte – Daniel, Maurício e Maria Luiza – por me fazerem sentir acolhida quando cheguei em BH. Muito obrigada.

Também não poderia deixar de agradecer a todos os meus ex-professores que fizeram parte da minha caminhada acadêmica. Cada um de vocês exerceu seu papel com dedicação e foi, para mim, como um degrau nessa jornada. Mas em especial, gostaria de agradecer à querida Anna Jacinta, minha orientadora na graduação, que me apresentou ao mundo da pesquisa e, com uma força sutil e inspiradora, me incentivou a seguir adiante, no mestrado e no doutorado.

Agradeço também ao professor Paulo Marinho, meu orientador do mestrado, que, mesmo em um período breve e desafiador, interrompido pela pandemia, me apoiou e orientou com paciência e dedicação, ajudando-me a concluir uma etapa muito importante da minha vida acadêmica. Agradeço de coração.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte dessa jornada: professores, técnicos administrativos e terceirizados que, de alguma forma, contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

Agradeço.

**“Quanto mais me aprofundo na Ciência mais certeza tenho que existe Deus”.**

**Albert Einstein**

## RESUMO

A disseminação do coronavírus SARS-CoV-2 para todos os continentes resultou na pandemia de COVID-19, responsável por mais de 7,1 milhões de mortes em todo o mundo. O desenvolvimento de novos fármacos antivirais é essencial para o controle de viroses atuais e emergentes, e os produtos naturais representam uma estratégia promissora para esse propósito. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral de extratos frente ao betacoronavírus MHV-3 e realizar o estudo fitoquímico de um extrato ativo selecionado, visando isolar os constituintes antivirais. Foram selecionados para triagem 14 extratos de plantas pertencentes a cinco famílias botânicas, priorizando espécies ricas em polifenóis complexos e/ou em flavonoides com padrão de oxigenação pouco usual e/ou com atividade anti-inflamatória e/ou antiviral descrita na literatura. Inicialmente foi avaliada *in vitro* a citotoxicidade dos extratos e todos eles apresentaram viabilidade celular superior a 80% nas concentrações de 10 e 30 µg/mL, exceto o extrato de *Baccharis maxima*. A atividade antiviral foi avaliada *in vitro* em células L929 infectadas com MHV-3, sendo os extratos administrados antes e após a infecção. O efeito antiviral foi determinado pelo ensaio de redução da formação de placas de lise. Observou-se redução do título viral após tratamento com os extratos de *Baccharis grandmucromata* (0,12 e 0,27 log de redução) e *Terminalia phaeocarpa* (0,93 e 2,64 log de redução). O extrato de *T. phaeocarpa* foi submetido a fracionamento preliminar por partição entre solventes imiscíveis e a atividade antiviral das frações resultantes (*n*-hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e hidrometanólica) foi ensaiada em concentrações não citotóxicas em células L929 infectadas com MHV-3. Todas as frações reduziram o título viral nas concentrações avaliadas (0,59 a 2,8 log de inibição), sendo a fração *n*-hexânica a mais ativa. A composição química do extrato e das frações ativas foi avaliada por HPLC-PDA, indicando a presença de compostos fenólicos. A fração *n*-hexânica foi refracionada por cromatografia em coluna aberta de sílica gel flash. Dois grupos de frações reunidas, de menor polaridade, possuindo aspectos graxos (CFJ10 e CFJ12) e tiveram sua composição química analisada por GC-MS. As análises indicaram tratar-se de misturas, sendo identificados 7 hidrocarbonetos, um triterpeno e um fitoesterol. Dois sólidos brancos (RFJ900 e RFJ1135) resultantes do refracionamento foram analisados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , possibilitando identificá-los inequivocamente como  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -amirina. A atividade antiviral do extrato de *T. phaeocarpa* e das frações obtidas, foi confirmada em células humanas Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2, com reduções de 0,56–2,31 log do título viral, sendo as frações diclorometânica e em acetato de etila as mais ativas. O perfil químico registrado por HPLC-PDA indicou predominância de compostos fenólicos. O estudo fitoquímico da fração acetato de etila levou ao isolamento de dois flavonoides monoglicosilados: quercitrina (quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo) e afzelina (canferol-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo), identificadas por análises de UPLC-PDA-ESI-MS/MS e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , com experimentos mono e bidimensionais. A ocorrência de quercitrina, afzelina,  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -amirina em *T. phaeocarpa* é aqui descrita pela primeira vez, bem dos hidrocarbonetos identificados. Estudos *in silico* anteriores indicam que os compostos isolados e identificados são potenciais ligantes de proteínas-chave do SARS-CoV-2, sugerindo sua participação na atividade antiviral observada. Em conclusão, os resultados obtidos demonstram o potencial de *T. phaeocarpa* como fonte de constituintes com ação antiviral.

Palavras-chave: MHV-3; SARS-CoV-2; *Terminalia phaeocarpa*; flavonoides; triterpenos.

## ABSTRACT

The spread of the SARS-CoV-2 coronavirus to all continents resulted in the COVID-19 pandemic, responsible for more than 7.1 million deaths worldwide. The development of new antiviral drugs is essential for the control of current and emerging viral infections, and natural products represent a promising strategy for this purpose. The present study aimed to evaluate the antiviral activity of plant extracts against the betacoronavirus MHV-3 and to carry out the phytochemical study of a selected active extract in order to isolate its antiviral constituents. A total of 14 plant extracts from five botanical families were selected for screening, prioritizing species rich in complex polyphenols and/or flavonoids with unusual oxygenation patterns and/or reported anti-inflammatory and/or antiviral activities. Initially, the *in vitro* cytotoxicity of the extracts was assessed, and all showed cell viability greater than 80% at concentrations of 10 and 30  $\mu\text{g/mL}$ , except for the extract of *Baccharis maxima*. The antiviral activity was evaluated *in vitro* using L929 cells infected with MHV-3, with the extracts administered both before and after infection. The antiviral effect was determined by the plaque reduction assay. A reduction in viral titer was observed after treatment with the extracts of *Baccharis grandmucromata* (0.12 and 0.27 log reduction) and *Terminalia phaeocarpa* (0.93 and 2.64 log reduction). The *T. phaeocarpa* extract was subjected to preliminary fractionation by solvent-solvent partitioning, and the antiviral activity of the resulting fractions (n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and hydromethanolic) was tested at non-cytotoxic concentrations in L929 cells infected with MHV-3. All fractions reduced viral titers at the tested concentrations (0.59 to 2.8 log inhibition), with the n-hexane fraction showing the highest activity. The chemical composition of the extract and active fractions was analyzed by HPLC-PDA, indicating the presence of phenolic compounds. The n-hexane fraction was further subfractionated by open-column flash chromatography on silica gel. Some combined groups of low-polarity fractions were obtained as solids and analyzed by GC-MS, revealing mixtures containing seven hydrocarbons, one triterpene, and one phytosterol. Two white solid compounds obtained from the subfractionation were analyzed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, allowing their unequivocal identification as  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -amyirin. The antiviral activity of the extract and its fractions was confirmed in human Calu-3 cells infected with SARS-CoV-2, showing viral titer reductions of 0.56–2.31 log, with the dichloromethane and ethyl acetate fractions being the most active. The chemical profile recorded by HPLC-PDA showed a predominance of phenolic compounds. The phytochemical study of the ethyl acetate fraction led to the isolation of two monoglycosylated flavonoids: quercitrin (quercetin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside) and afzelin (kaempferol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside), identified by UPLC-PDA-ESI-MS/MS and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analyses, including 1D and 2D experiments. The occurrence of quercitrin, afzelin,  $\beta$ -sitosterol, and  $\beta$ -amyirin in *T. phaeocarpa* is reported here for the first time, as well as the identified hydrocarbons. Previous *in silico* studies indicate that the isolated and identified compounds are potential ligands of key SARS-CoV-2 proteins, suggesting their contribution to the observed antiviral activity. In conclusion, the results demonstrate the potential of *T. phaeocarpa* as a source of constituents with antiviral properties.

Keywords: MHV-3; SARS-CoV-2; *Terminalia phaeocarpa*; flavonoids, triterpenes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modelo proposto de evolução do coronavírus	33
<b>Figura 2:</b> Identificação dos coronavírus ao longo dos anos	34
<b>Figura 3:</b> Partículas virais do MHV observada em microscópio eletrônico	35
<b>Figura 4:</b> Estrutura do coronavírus MHV com cinco proteínas estruturais	36
<b>Figura 5:</b> Distribuição de casos confirmados em março de 2020	40
<b>Figura 6:</b> Proteínas estruturais do SARS-CoV-2: Spike (S), envelope (E), membrana (M) proteínas nucleocásidas (N)	42
<b>Figura 7:</b> Ciclo de multiplicação viral do SARS-CoV-2	43
<b>Figura 8:</b> Sequência da proteína Spike do SARS-CoV-2. Domínio de ativação de terminal NTD, domínio de ligação do receptor RBD, subdomínio SD	43
<b>Figura 9:</b> Registro de ocorrência da <i>Terminalia phaeocarpa</i> no Brasil	55
<b>Figura 10:</b> Morfologia de <i>T. phaeocarpa</i> . Árvore (A), folhas e flores (B) frutos e endocarpo (C).	56
<b>Figura 11:</b> Fracionamento do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> por partição entre solventes imiscíveis e massas das frações obtidas	71
<b>Figura 12:</b> Etapas do ensaio de citotoxicidade das espécies selecionadas	74
<b>Figura 13:</b> Esquema de placa para ensaio de citotoxicidade	75
<b>Figura 14:</b> Esquema de placa para ensaio de atividade antiviral	77
<b>Figura 15:</b> Esquema do ensaio de atividade antiviral	78
<b>Figura 16:</b> Esquema de placa para ensaio de titulação viral	80
<b>Figura 17:</b> Esquema do ensaio de titulação viral	80
<b>Figura 18:</b> Viabilidade celular dos extratos (10, 30 e 90 µg/mL) avaliada em células L929	96
<b>Figura 19:</b> Curva de multiplicação de MHV-3 em fibroblastos murinos L929	98
<b>Figura 20:</b> Viabilidade de células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com extratos	100
<b>Figura 21:</b> <b>A)</b> Viabilidade de células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com extrato de <i>T. phaeocarpa</i> . Células L929 ( $1 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e infectadas com MHV-3, procedendo-se ao tratamento com extrato de <i>T. phaeocarpa</i> . <b>B)</b> Ensaio de formação de placas de lise em células de	102

fibroblasto murino (L929) infectadas com coronavírus murino MHV-3 frente ao tratamento com extrato de *T. phaeocarpa*

**Figura 22:** Atividade antiviral das frações resultantes do fracionamento do extrato de *T. phaeocarpa* por partição entre solventes imiscíveis. **A)** Viabilidade celular das frações (10 e 30 µg/mL) avaliada em células L929. **B)** Viabilidade de células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com frações de *T. phaeocarpa*. **C)** Ensaio de formação de placas em células de fibroblasto murino (L929) infectadas com coronavírus murino MHV-3 frente ao tratamento com frações de *T. phaeocarpa*

106

**Figura 23:** Viabilidade celular dos extratos etanólicos de *B. grandmucromata* e *T. phaeocarpa* e frações (10 e 30 µg/mL) avaliada em células Calu-3

112

**Figura 24:** Ensaio de formação de placas em células epiteliais do trato respiratório humano (Calu-3) infectadas com coronavírus humano SARS-CoV-2 frente ao tratamento com extratos e frações

114

**Figura 25:** Curvas de concentração-resposta empregadas para o cálculo da concentração citotóxica para 50% das células não infectadas (CC<sub>50</sub>) e da concentração efetiva para 50% das células infectadas com vírus MHV-3 (CE<sub>50</sub>) na linhagem celular L929. **A:** extrato de *T. phaeocarpa*, **B:** fração *n*-hexânica, **C:** fração dicolorometânica, **D:** fração em acetato de etila, **E:** fração hidrometanólica

121

**Figura 26:** Perfis químicos do extrato de *T. phaeocarpa* obtidas em CCD de sílica gel empregando diferentes condições de eluição com *n*-hexano e EtOAc e reveladas com anisaldeído sulfúrico

122

**Figura 27:** Cromatograma obtido por HPLC-PDA para o extrato etanólico de folhas de *T. phaeocarpa* adquirido nos comprimentos de onda de 210 nm. Os espectros no UV registrados para os picos com *t<sub>r</sub>* = 9,74 min (a), 10,12 min (b) e 12,49 min (c) apresentam máximos de absorção compatíveis com flavonoides, enquanto aqueles em (d) 2,31 min, (e) 3,04 min, apresentam máximos a de absorção compatíveis com taninos

124

**Figura 28:** Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos (a) no UV, (b) no modo de ionização negativo (ESI-) e (c) no modo de ionização positivo (ESI+). Condições cromatográficas: vide item 4.22.3

125

**Figura 29:** Esquema de fracionamento do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* e refracionamento da fração *n*-hexânica, indicando as analisadas por GC-MS e RMN

127

**Figura 30:** Comparação entre perfil cromatográfico A= CFJ10, B= CFJ12, C= padrão sintético série C<sub>9</sub>C<sub>40</sub> e D= espectro de massas para a substância hentriacontano com TR = 40.105 e 40.110 min no cromatograma de íons totais (TIC)

129

**Figura 31:** Fragmentação para a substância hentriacontano registrado para as amostras CFJ10 e CFJ12 de Fr. Hex de *T. phaeocarpa*

130

**Figura 32:** Estruturas químicas de constituintes identificados em frações derivadas da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* por GC-MS

130

**Figura 33:** Expansões do espectro de RMN de <sup>13</sup>C obtido para RFJ900 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

135

**Figura 34:** Subespectro DEPT-135 obtido para RFJ900 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)

136

<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para RFJ900 e expansões ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	<b>136</b>
<b>Figura 36:</b> Espectro de massa obtido por GC-MS e proposta de fragmentação com os fragmentos $m/z$ 218 e $m/z$ 203 da molécula $\beta$ -amirina $m/z$ 426 $\text{M}^+$ (RFJ900)	<b>140</b>
<b>Figura 37:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para RFJ1135 e expansões ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)	<b>142</b>
<b>Figura 38:</b> Subespectro DEPT-135 obtido para RFJ1135 e expansões ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)	<b>143</b>
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para RFJ1135 e expansões ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	<b>146</b>
<b>Figura 40:</b> Espectro de massa obtido por GC-MS e proposta de fragmentação com os fragmentos $m/z$ 107; $m/z$ 207; $m/z$ 329 da molécula $\beta$ -sitosterol $m/z$ 414 $\text{M}^+$ (RFJ1135)	<b>147</b>
<b>Figura 41:</b> Cromatograma obtido por HPLC-PDA para a fração EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i>	<b>152</b>
<b>Figura 42:</b> Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para Fr. EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos (a) no UV, (b) no modo de ionização negativo (ESI-) e (c) no modo de ionização positivo (ESI+). Condições cromatográficas: vide item 4.22.3.1	<b>153</b>
<b>Figura 43:</b> Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de <i>Terminalia phaeocarpa</i> , refracionamento da fração EtOAc, e subfrações obtidas para análises por RMN	<b>154</b>
<b>Figura 44:</b> Cromatograma obtido por HPLC-PDA para a fração SFJ448 obtida do refracionamento da fração de EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> . O espectro no UV foi obtido online para o pico principal ( $t_r = 16,62$ min)	<b>155</b>
<b>Figura 45:</b> Cromatograma obtido por HPLC-UV em escala preparativa para a fração SFJ448 com detecção no UV em 350 nm com destaque para o pico 4 de interesse	<b>156</b>
<b>Figura 46:</b> Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância QCT48 obtida do refracionamento de EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos (a) no UV, (b) no modo de ionização negativo (ESI-) e (c) no modo de ionização positivo (ESI+)	<b>156</b>
<b>Figura 47:</b> Espectros obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância QCT48 adquiridos no UV (vermelho), no modo de ionização positivo (ESI+) (roxo) e no modo de ionização negativo (ESI-) (verde)	<b>157</b>
<b>Figura 48:</b> Fragmentação do mono glicosídeo em $m/z$ 449 $[\text{M} + \text{H}]^+$ para gerar a aglicona em $m/z$ 303 $[\text{M} - 147 + \text{H}]^+$	<b>158</b>
<b>Figura 49:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para a substância QCT48 e expansões ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz)	<b>159</b>
<b>Figura 50:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ obtido para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz)	<b>161</b>
<b>Figura 51:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (a) e subespectro DEPT-135 (b) obtidos para substância QCT48, com a atribuição dos sinais de ressonância do carbono carbonílico e dos carbonos substituídos com hidroxilas fenólicas (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	<b>163</b>
<b>Figura 52:</b> Expansões do subespectro DEPT-135 obtidos para a substância QCT48 (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	<b>164</b>

<b>Figura 53:</b> Expansão do mapa de contornos COSY demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de $^1\text{H}$ via $^3J$ obtido para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz)	167
<b>Figura 54:</b> Mapa de correlação mononuclear COSY obtido para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz)	168
<b>Figura 55:</b> Mapa de contorno heteronuclear HMBC demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ via $^3J$ para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz para $^1\text{H}$ e 150 MHz para $^{13}\text{C}$ )	170
<b>Figura 56:</b> Mapa de contorno heteronuclear HMBC demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ via $^3J$ para os sinais da ramnose ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz para $^1\text{H}$ e 150 MHz para $^{13}\text{C}$ )	171
<b>Figura 57:</b> Cromatograma obtido por HPLC-PDA com detecção em maxplot para a fração SFJ432 oriunda do refractionamento da fração de EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i>	175
<b>Figura 58:</b> Cromatograma obtido por HPLC-PDA em escala preparativa para a fração SFJ432 com detecção em 350 nm	176
<b>Figura 59:</b> Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância AFZ32 com detecção no UV (roxo) e por MS nos modos de ionização positivo (ESI+) (vermelho) e negativo (ESI-) (verde)	176
<b>Figura 60:</b> Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância AFZ32 obtida do refractionamento de EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos (a) no UV e por MS nos modos de ionização (b) negativo (ESI-) e (c) positivo (ESI+)	177
<b>Figura 61:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ obtido para a substância AFZ32 e expansões ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz)	179
<b>Figura 62:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (a) e subespectro DEPT-135 (b) obtidos para a substância AFZ32, com indicação da atribuição do sinal de ressonância do carbono carbonílico e carbono com hidroxilas fenólicas (150 MHz, DMSO)	181
<b>Figura 63:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (a) e subespectro DEPT-135 (b) obtidos para a substância AFZ32, com indicação da atribuição do sinal de ressonância do carbono carbonílico e carbono com hidroxilas fenólicas (150 MHz, DMSO)	182
<b>Figura 64:</b> Expansões do subespectro DEPT-135 obtidos para substância AFZ32 ( $\text{DMSO-d}_6$ ; 150 MHz,)	184
<b>Figura 65:</b> Mapa de correlação mononuclear COSY obtido para a substância AFZ32 ( $\text{DMSO-d}_6$ ; 600 MHz,)	186
<b>Figura 66:</b> Mapa de contorno heteronuclear HMBC demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ via $^3J$ para a substância AFZ32	188
<b>Figura 67:</b> Mapa de contorno heteronuclear HMQC obtido para a substância AFZ32	190
<b>Figura 68:</b> Comparação estrutural entre a canferol, afzelina e a trifolina, diferenças entre os açúcares ligados (ramnose na afzelina e galactose na trifolina) e estereoquímica das hidroxilas em C-3'' e C-4''	222
<b>Figura 69:</b> Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de GFJ10	222
<b>Figura 70:</b> Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de GFJ12	223
<b>Figura 71:</b> Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de GFJ12	223
<b>Figura 72:</b> Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de RFJ900	223

<b>Figura 73:</b> Espectro de massas obtido por GC-MS de RFJ900	224
<b>Figura 74:</b> Espectro de massas obtido por GC-MS de RFJ1135	225
<b>Figura 75:</b> Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no UV (roxo).	226
<b>Figura 76:</b> Cromatograma obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a fração <i>n</i> -hexânica de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV e por MS nos modos de ionização (b) negativo (ESI-) e (c) positivo (ESI+)	227
<b>Figura 77:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a fração DCM de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV e por MS nos modos de ionização (b) negativo (ESI-) e (c) positivo (ESI+)	228
<b>Figura 78:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico A do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 259 e 377 nm	229
<b>Figura 79:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico B do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 258 e 377 nm	230
<b>Figura 80:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico C do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 258 e 378 nm	231
<b>Figura 81:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico D do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 259 e 382 nm	232
<b>Figura 82:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico E do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 259 e 382 nm	233
<b>Figura 83:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico F do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 256 e 378 nm	234
<b>Figura 84:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico G do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 255 e 348 nm	235
<b>Figura 85:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico H do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 223 e 277 nm	236
<b>Figura 86:</b> Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico I do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 224 nm	237

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espécies de <i>Terminalia</i> com atividade antiviral.....	<b>52</b>
<b>Tabela 2:</b> Espécies vegetais selecionadas para estudo.....	<b>69</b>
<b>Tabela 3:</b> Gradiente de eluição utilizado para obtenção do perfil fitoquímico do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> .....	<b>83</b>
<b>Tabela 4:</b> Gradiente de eluição estabelecido para obtenção do perfil fitoquímico dos extratos etanólicos de <i>T. phaeocarpa</i> e Fr Hex, Fr DCM, Fr EtOAc e MeOH/H <sub>2</sub> O.....	<b>84</b>
<b>Tabela 5:</b> Gradiente de eluição estabelecido para obtenção do perfil fitoquímico das subfrações SFJ 448 e SFJ432.....	<b>86</b>
<b>Tabela 6:</b> Gradiente de eluição em coluna de sílica gel empregada para o refração da Fr. Hex de <i>T. phaeocarpa</i> .....	<b>87</b>
<b>Tabela 7:</b> Agrupamento das frações resultantes do fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>T. phaeocarpa</i> .....	<b>90</b>
<b>Tabela 8:</b> Gradiente de eluição em coluna de Sephadex LH20 empregada no refração da Fr. EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> .....	<b>91</b>
<b>Tabela 9:</b> Agrupamento das frações resultantes do fracionamento da fração EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> em coluna de Sephadex LH20.....	<b>93</b>
<b>Tabela 10:</b> Gradiente de eluição empregado no fracionamento por HPLC em escala preparativa.....	<b>93</b>
<b>Tabela 11:</b> Fracionamento do extrato etanólico de <i>T. phaeocarpa</i> por partição entre solventes imiscíveis: rendimentos percentuais massa/massa (% m/m) obtidos e comparação com rendimentos relatados anteriormente por Gomes (2021).....	<b>104</b>
<b>Tabela 12:</b> Composição química dos grupos de frações reunidas GFJ10, GFJ12, RFJ811 e RFJ1134 de <i>T. phaeocarpa</i> , identificada por GC-MS.....	<b>119</b>
<b>Tabela 13:</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H obtidos para RFJ900 (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e dados da literatura relatados para β-amirina (CDCl <sub>3</sub> , <sup>a,c</sup> 500 e <sup>b</sup> 600 MHz).....	<b>126</b>
<b>Tabela 14:</b> Composição química dos grupos de frações reunidas GFJ10, GFJ12, RFJ811 e RFJ1134 de <i>T. phaeocarpa</i> , identificada por GC-MS.....	<b>131</b>

<b>Tabela 15:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ obtidos para RFJ900 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e dados da literatura relatados para $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , $^a$ 500 e $^b$ 600 MHz).....	<b>137</b>
<b>Tabela 16:</b> Atribuição dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ de RFJ900 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) e comparação com dados da literatura para $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , $^a$ 125 e $^b$ 150 MHz).....	<b>138</b>
<b>Tabela 17:</b> Atribuições dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ de RFJ1135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) e comparação com dados da literatura para o $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ , $^a$ 150 e $^b$ 50,3 MHz).....	<b>144</b>
<b>Tabela 18:</b> Atribuição dos sinais de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de RFJ1135 e dados da literatura relatados para o $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ , $^a$ 600 e $^b$ , $^c$ 400 MHz).....	<b>145</b>
<b>Tabela 19:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ obtidos para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) e dados da literatura relatados para a quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnosídeo (quercitrina) ( $\text{DMSO-d}_6$ , $^a$ , $^b$ 400 MHz, $^c$ $\text{CD}_3\text{OD}$ 500 MHz).....	<b>160</b>
<b>Tabela 20:</b> Atribuição dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) e comparação com dados da literatura para a quercitrina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , $^a$ 125 MHz e $^b$ 100 MHz).....	<b>165</b>
<b>Tabela 21:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ obtidos para a substância AFZ32 ( $\text{DMSO-d}_6$ , 600 MHz) e dados da literatura relatados para o canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnosídeo (afzelina) ( $^a$ $\text{DMSO-d}_6$ ; $^b$ acetona $\text{d}_6$ ).....	<b>180</b>
<b>Tabela 22:</b> Atribuição dos sinais de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância AFZ32 ( $\text{DMSO-d}_6$ , 150 MHz) e comparação com dados da literatura para a afzelina ( $\text{DMSO-d}_6$ , $^a$ 75 MHz e $^b$ 100 MHz).....	<b>185</b>

## LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

1. Remdesivir	46
2. Favipiravir	47
3. Nirmatrelvir	47
4. Molnupiravir	47
5. Isomentona	49
6. (-) pulegone	49
7. $\alpha$ -terpineol	49
8. $\beta$ -copaeno	49
9. $\beta$ -Cariofileno	49
10. Arjunina	49
11. Punicalina	49
12. 4-O-(2'',4''-di-O-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) ácido elágico	50
13. 4-O-(4''-O-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) ácido elágico	50
14. 4-O-(3'',4''-di-O-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) ácido elágico	50
15. 5,7,2'-Tri-O-metilflavanona-4'-O- $\alpha$ -L-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicosídeo	50
16. Arjunona	50
17. Flavanona	50
18. Termilignana	50
19. Anolignana B	50
20. Terminalosídeo M	50
21. Ácido brevifolincarboxílico	50
22. Ácido vanílico	50
23. 4-O- $\beta$ -D-(6'-O-galoil) glicosídeo	51
24. 3-O-galoil-D-glicose	51
25. Ácido vanílico	51
26. Ácido protocatecuico	51
27. $\beta$ -Sitosterol	51
28. $\beta$ -Sitosterol-3-acetato	51
29. Palmitato de $\beta$ -sitosterila	51
30. Estigmasterol 3-O- $\beta$ -d-glicosídeo	51
31. Estigma-4-eno-3-ona	51
32. 16,17-Di-hidroneridienona 3-O- $\beta$ -d-glucosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -d-galactosídeo	51
33. Canogenol 3-O- $\beta$ -d-galactosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -l-ramnosídeo	51
34. Gluconolactona	51
35. Metoxicarboniloximetil metilcarbonato	51
36. Acetato de Citronelila	51
37. Laxiflorina	51
38. Casuarinina	54
39. Ácido chebulágico	55
40. Ácido chebulínico	55
41. 1,2,3,4,6-pentagaloilglicose	55
42. Ácido tânico	56

43. Ácido gálico	58
44. Ácido 3,4-diidroxifenilacético	58
45. Ácido 4-hidroxi-3-etoxifenilacético	58
46. Punicalina	58
47. Ácido 4-O-(3",4"-di-O-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) elágico	58
48. Mirecetina glicosídeo	58
49. Miricetina	59
50. alfa-galoil-punicalagina	59
51. 7"-O-metil-agatisflavona	60
52. Amentoflavona	60
53. Canferol 3-O-rutinosídeo	61
54. 6-O-(4-hidroxibenzoyl)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-hidroxifenila)	61
55. Rutina	61
56. Epicatequina	61
57. Agastiflavona	61
58. Biflavanonas ourateínas A	62
59. Biflavanonas ourateínas B	62
60. Biflavanonas ourateínas C	62
61. Biflavanonas ourateínas D	62
62. Sakuranetina (5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona)	64
63. 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	64
64. Ácido ent-kaur-16-en-19-óico	64
65. Ácido 15 $\beta$ -hidroxi-ent-kaur-16-en-19-óico (ácido grandiflórico)	64
66. Ácido 15 $\beta$ -senecioiloxi-ent-kaur-16-en-19-óico	64
67. Ácido 15 $\beta$ -tiglinoiloxi-ent-kaur-16-en-19-óico	64
68. Apigenina	64
69. Ácido brevifolincarboxílico	107
70. Punicalina	107
71. Rutina	108
72. Arjunetina	110
73. Arjunglicosídeo I	110
74. Chebulosídeo I	111
75. Belericosídeo	111
76. Ácido maslínico	111
77. $\beta$ -sitosterol	111
78. Daucosterol	112
79. Ácido protocatecuico	117
80. Ácido elágico	117
81. Miricitrina	117
82. Brasilina	118
83. Curcumina	118
84. Theaflavina-3,3'-digalato	118
85. Ácido cafeico	119

<b>86.</b> Catequina	<b>119</b>
<b>87.</b> $\beta$ -amirina	<b>136</b>
<b>88.</b> $\beta$ -sitosterol	<b>143</b>
<b>89.</b> Ácido ursólico	<b>151</b>
<b>90.</b> glicirrizina	<b>152</b>
<b>91.</b> Celastrol	<b>152</b>
<b>92.</b> Quercetina-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnosídeo (quercitrina)	<b>170</b>
<b>93.</b> canferol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (afzelina)	<b>184</b>
<b>94.</b> isoginkgetina	<b>192</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius.
µg	Micrograma.
µL	Microlitro.
µM	Micromolar.
3CLpro	Protease semelhante à quimotripsina 3 (do inglês <i>The 3-chymotrypsin-like protease</i> ).
Å	Angstrom
Arg 188	Arginina (posição 188).
Asn 142	Asparagina (posição 142).
AT2	Alveolares Tipo 2.
Calu-3	Células epiteliais pulmonares humanas.
CASP3	Caspase 3.
CASP8	Caspase 8.
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica 50%.
CCD	Cromatografia em camada delgada.
CCoV	Coronavírus canino.
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado.
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva.
Covid-19	Doença respiratória aguda por SARS-CoV-2.
CoVs	Coronavírus.
Cys 145	Cisteína (posição 145).
DCM	Diclorometano.
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2.
EMA	Agência Europeia de Medicamentos (do inglês <i>European Medicines Agency</i> ).
ESI	“Electrospray Ionization”.
EtOAc	Acetato de etila.
FBS	Soro Fetal Bovino.
FCoV	Coronavírus felino.

<b>FDA</b>	Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i> ).
<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas.
<b>Gln 377</b>	Glutamina (posição 377).
<b>Glu 166</b>	Ácido glutâmico (posição 166).
<b>Glu119, 228, 278</b>	Ácido glutâmico (posições 119, 228, e 278).
<b>Gly 143</b>	Glicina (posição 143).
<b>H1N1</b>	Subtipo do vírus <i>Influenza A</i> .
<b>HCoV</b>	Coronavírus humano.
<b>Hex</b>	Hexano.
<b>HPLC-PDA</b>	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada a Detector de Conjunto de Fotodiodos (do inglês <i>High-performance liquid chromatography</i> ).
<b>IBV</b>	Vírus da Bronquite Infecciosa.
<b>ICEX</b>	Instituto de Ciências Exatas.
<b>IFNY</b>	Interferon gamma.
<b>IL1-β</b>	Interleucina 1 beta.
<b>IL-6</b>	Interleucina-6.
<b>Ile 452</b>	Isoleucina (posição 452).
<b>Kcal/mol</b>	Quilocalorias por mol.
<b>L929</b>	Linhagem de Células de fibroblasto murino (ATCC – CCL1).
<b>Lys 449</b>	Lisina (posição 449).
<b>MeOH</b>	Metanol.
<b>MERS-CoV</b>	Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio.
<b>Mg</b>	Miligrama.
<b>MHV-3</b>	Vírus de Hepatite Murina (do inglês <i>Mouse hepatitis virus</i> ).
<b>MOI</b>	Multiplicidade de Infecção (do inglês <i>Multiplicity of Infection</i> ).
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro.
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Fator de transcrição central na regulação da resposta imune e inflamatória (do inglês <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, subunidade p65</i> ).
<b>Ns</b>	Nanosegundos (do inglês <i>Nanoseconds</i> ).

<b>NTP</b>	Nucleosídeo trifosfato ativo.
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde.
<b>PB2</b>	Subunidade da RNA polimerase viral do Influenza A (do inglês <i>Polymerase Basic Protein 2</i> ).
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato-Salino.
<b>PEDV</b>	Vírus da diarreia epidêmica suína.
<b>PHEV</b>	Vírus da encefalomielite hemaglutinante porcina.
<b>PRCV</b>	Coronavírus respiratório suíno.
<b>RAW 264.7</b>	Linha celular de macrófagos murinos.
<b>RBD</b>	Domínio de ligação receptora.
<b>RdRp</b>	Polimerase RNA dependente de RNA.
<b>RMSD</b>	Desvio Quadrático Médio da Raiz (do inglês <i>Root Mean Square Deviation</i> ).
<b>RMSF</b>	Flutuação Quadrática Média da Raiz (do inglês <i>Root Mean Square Fluctuation</i> ).
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2.
<b>TCoV</b>	“Turkey” Coronavírus.
<b>TGEV</b>	Vírus gastroenterite transmissível.
<b>Thr 26</b>	Treonina (posição 26).
<b>Thr 447</b>	Treonina (posição 447).
<b>TLR</b>	Receptor do tipo Toll (do inglês <i>Toll-Like Receptor</i> ).
<b>TMPRSS2</b>	Protease Transmembrana Serina 2.
<b>TNF</b>	Fatores de Necrose Tumoral.
<b>UPLC-PDA-ESI-MS</b>	Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Conjunto de Fotodiodos e Espectrômetro de Massas com Fonte de Ionização por Electrospray (do inglês <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to a Photodiode Array Detector and a Mass Spectrometer with Electrospray Ionization Source</i> ).
<b>UV</b>	Ultravioleta-Visível.
$\delta$	Deslocamento químico.
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda máximo.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	30
2. OBJETIVO GERAL.....	32
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	33
3.1 Coronavírus (CoVs): histórico, epidemiologia e taxonomia.....	33
3.2 Vírus MHV .....	35
3.3 Histórico e epidemiologia do SARS-CoV-2 .....	38
3.4 Genoma e ciclo de replicação viral do SARS-CoV-2 .....	41
3.5 Transmissão e profilaxia.....	44
3.6 Patogênese e resposta imune .....	44
3.7 Abordagens terapêuticas antivirais disponíveis.....	45
3.8 Gênero <i>Terminalia</i> Linnaeus .....	47
3.9 Espécies de <i>Terminalia</i> com atividade antiviral.....	52
3.10 <i>Terminalia phaeocarpa</i> Eichler.....	55
3.11 Gênero <i>Ouratea</i> .....	58
3.12 Espécies de <i>Ouratea</i> com atividade antiviral .....	61
3.13 Gênero <i>Baccharis</i> .....	62
3.14 Atividade antiviral do gênero <i>Baccharis</i> .....	64
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	65
4.1 Solventes e reagentes.....	65
4.2 Materiais diversos.....	65
4.3 Equipamentos .....	66
4.4 Eluentes para CCD .....	67
4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	67
4.6 Revelador para CCD.....	67
4.7 Extratos para estudo.....	68

4.8 Material Vegetal .....	70
4.9 Preparo dos extratos vegetais .....	70
4.10 Fracionamento preliminar do extrato de <i>T. phaeocarpa</i> .....	71
4.11 Ensaio biológicos <i>in vitro</i> .....	71
4.12 Linhagem de células e vírus .....	72
4.13 Cultivo celular .....	72
4.14 Preparo dos extratos para ensaio de citotoxicidade .....	73
4.15 Avaliação da citotoxicidade dos extratos .....	73
4.16 Determinação da Multiplicidade de Infecção – MOI .....	76
4.17 Avaliação da atividade antiviral .....	76
4.18 Ensaio de atividade antiviral.....	77
4.18.1 MHV-3 .....	77
4.18.2 SARS-CoV-2 .....	78
4.19 Titulação viral.....	79
4.20 Ensaio para determinação da CC <sub>50</sub> , CE <sub>50</sub> e cálculo do IS .....	81
4.21 Análises estatísticas .....	82
4.22 Estudo fitoquímico dos extratos selecionados.....	82
4.22.1 Análise dos extratos e frações obtidas por técnicas cromatográficas hifenadas.....	82
4.22.2 Análises cromatográficas por HPLC-PDA.....	83
4.22.3 Análises cromatográficas por UPLC-PDA-ESI-MS/MS .....	83
4.22.4 Refracionamento da Fr. Hex de <i>T. phaeocarpa</i> .....	86
4.22.5 Análises por Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS).....	88
4.22.5.1 Determinação dos índices de retenção.....	89
4.22.6 Análises dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	89
4.22.7 Refracionamento da Fr. EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> .....	90
4.22.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala preparativa.....	91

4.22.9 Análises cromatográficas por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para as subfrações SFJ448 e SFJ432.....	93
4.22.10 Análises dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para as substâncias QCT48 e AFZ32.....	94
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
5.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais .....	95
5.2 Determinação da Multiplicidade de Infecção e avaliação da atividade antiviral .....	97
5.3 Fracionamento do extrato de <i>T. phaeocarpa</i> .....	104
5.3.1 Avaliação da atividade antiviral das frações obtidas do extrato de <i>T. phaeocarpa</i> .....	104
5.4 Avaliação da atividade anti-SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> de extratos e frações selecionadas ...	111
5.5 Determinação de CC <sub>50</sub> , CE <sub>50</sub> e IS para o extrato de <i>T. phaeocarpa</i> e suas frações.....	119
5.6 Estudo fitoquímico de <i>T. phaeocarpa</i> .....	122
5.6.1 Caracterização cromatográfica do extrato de <i>T. phaeocarpa</i> por HPLC-PDA e UPLC-PDA-ESI-MS/MS.....	123
5.6.2. Refracionamento da fração hexânica de <i>T. phaeocarpa</i> .....	126
5.7 Identificação estrutural de constituintes de <i>T. phaeocarpa</i> por GC-MS .....	127
5.7.1 Hentriacontano.....	128
5.8 Identificação estrutural dos sólidos isolados de <i>T. phaeocarpa</i> .....	134
5.8.1 Isolamento e elucidação estrutural de RFJ900 .....	134
5.8.2 Isolamento e elucidação estrutural de RFJ1135 .....	141
5.8.3 Refracionamento da fração EtOAc de <i>T. phaeocarpa</i> .....	151
5.8.4 Isolamento e elucidação estrutural de QCT48.....	155
5.8.5 Isolamento e elucidação estrutural de AFZ32 .....	174
6. CONCLUSÃO.....	194
REFERÊNCIAS .....	195
APÊNDICE A - CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS.....	223
APÊNDICE B - CROMATOGRAMAS OBTIDOS por UPLC-PDA-ESI-MS/MS.....	226
APÊNDICE C - ESPECTROS OBTIDOS POR UPLC-PDA-ESI-MS/MS.....	230

## 1. INTRODUÇÃO

Os coronavírus, pertencentes à família *Coronaviridae*, são vírus zoonóticos, de RNA de sentido positivo e fita simples, de aproximadamente 32 quilobases, capazes de causar doenças respiratórias em animais e humanos (YADAV et al., 2021). Dois coronavírus humanos altamente patogênicos foram identificados nas últimas décadas, o SARS-CoV, identificado em 2003, que infectou cerca de 8.422 pessoas em 32 países, causando epidemia de novembro de 2002 a julho 2003, e o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), identificado em 2012, que infectou 2040 pessoas em 27 países no Oriente Médio, causando epidemia local (CHAFEKAR et al., 2018; CHINSEMBU, 2020).

Mais recentemente, o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave tipo 2 (SARS-CoV-2), foi identificado como um novo coronavírus humano em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, China, atingindo todos os continentes em poucos meses, sendo decretada a pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em março de 2020. A síndrome respiratória aguda grave causada pelo SARS-CoV-2, denominada de Covid-19, é altamente letal e o Brasil registra, até o momento, mais 716.626 mil mortes pela doença (Secretaria de Vigilância em Saúde | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2025).

Sua transmissão ocorre por meio de gotículas das vias aérea respiratórias expelidas por portadores assintomáticos, pré-sintomáticos e sintomáticos (WIERSINGA et al., 2020). O surgimento dos sintomas após contaminação ocorre no tempo médio de 5 dias, facilitando a propagação do vírus, tendo em vista que pessoas contaminadas transitam o vírus antes do surgimento dos primeiros sintomas (LIU et al., 2020). Os sintomas causados pela Covid-19 incluem, dor de cabeça, febre, tosse, falta de ar e fadiga. Estudos preliminares da OMS associavam o agravamento da Covid-19 a pessoas com mais de 60 anos e a indivíduos com comorbidades tais como hipertensão, diabetes, doenças respiratórias e obesidade. No entanto, observa-se que diferentes pacientes foram a óbito sem apresentar nenhum desses fatores.

O avanço da doença foi contido com a produção de vacinas e alta cobertura vacinal; contudo, o surgimento de novas variantes ameaça a efetividade e a durabilidade das vacinas (EYRE et al., 2022). Neste contexto, faz-se necessário desenvolver novos agentes antivirais efetivos contra o SARS-CoV-2 e outros coronavírus, e a avaliação de produtos naturais de plantas apresenta-se como uma estratégia válida. Na China, a Comissão Nacional de Saúde

autorizou o uso de fitoterápicos como terapia complementar para a COVID-19 em conjunto com a medicina ocidental (ANG et al., 2020).

Substâncias de origem natural, incluindo alcaloides, flavonoides, antraquinonas, ligninas e taninos, a bem como compostos organossulfurados, limonoides, sulfetos, cumarinas, terpenóides, saponinas, clorofilinas, compostos furílicos, poliínas, tiofenos, proteínas, peptídeos e terpenos apresentaram atividade antiviral frente ao SARS-CoV-2 em ensaios *in vitro*, *in vivo* e *in silico* (PEREIRA et al., 2021; CHINSEMBU et al., 2020). Dessa forma, substâncias bioativas presentes em plantas representam uma estratégia promissora para o desenvolvimento de fármacos antivirais.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar produtos naturais bioativos potencialmente úteis como agentes anti-SARS-CoV-2, a partir da investigação fitoquímica e de atividade biológica de espécie dos gêneros *Terminalia*, *Ouratea* e *Baccharis*.

## 2. OBJETIVO GERAL

Realizar a triagem antiviral de extratos vegetais frente ao betacoronavírus murino MHV-3 e realizar estudo fitoquímico do extrato selecionado, visando identificar constituintes ativos contra o SARS-CoV-2.

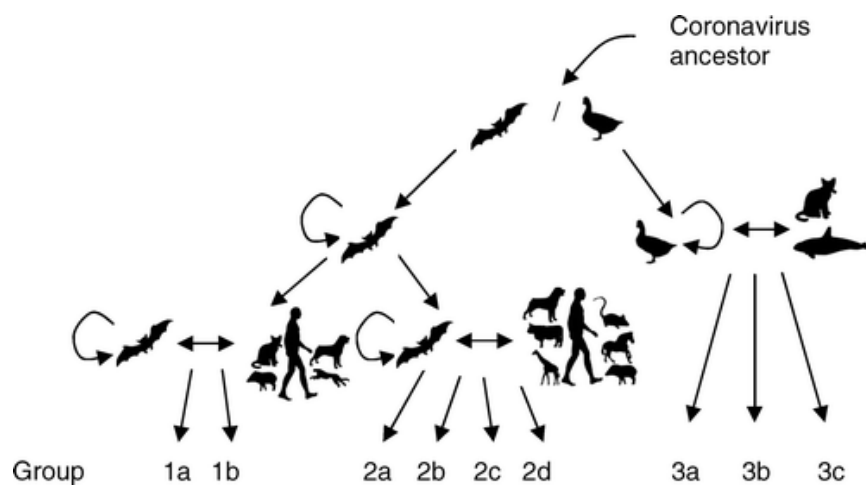
### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Selecionar extratos vegetais ricos em polifenóis complexos e/ou em flavonoides com padrão de oxigenação pouco usual e/ou com atividade anti-inflamatória e/ou antiviral descrita na literatura disponíveis na extratoteca do laboratório de Fitoquímica para triagem de atividade antiviral;
2. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos em concentrações não citotóxicas em cultura de fibroblastos L929 infectados com o coronavírus murino MHV-3;
3. Realizar o fracionamento do extrato mais ativo e avaliar a atividade antiviral *in vitro* das frações obtidas em cultura de fibroblastos L929 infectados com o coronavírus murino MHV-3;
4. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos e frações mais ativos em cultura de células epiteliais pulmonares humanas (Calu-3) infectadas com o coronavírus SARS-CoV-2;
5. Realizar o isolamento e elucidação estrutural das substâncias constituintes das frações ativas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Coronavírus (CoVs): histórico, epidemiologia e taxonomia

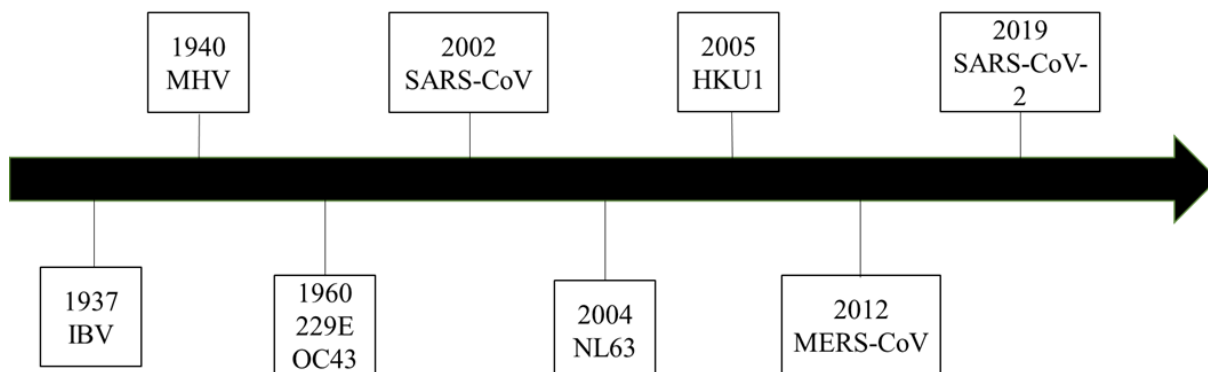
Os coronavírus são patógenos zoonóticos da ordem dos *Nidovirus*, pertencentes à família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae*. São vírus de RNA positivo, pleomórficos ou esféricos, medindo de 80 a 220 nm de diâmetro, envelopados, de fita simples com tamanho de 25 a 31 Kb. Eles recebem o nome de coronavírus devido a aparência ultraestrutural em forma de coroa, formado pelas proteínas *spike* na superfície do vírus (HAAKE et al., 2020).



**Figura 1:** Modelo proposto de evolução do coronavírus (WOO et al., 2009).

O primeiro coronavírus identificado foi o vírus da bronquite infecciosa (IBV), isolado de embriões de galinha em 1937. Na década de 1940 foi identificado o vírus da hepatite de camundongo (MHV) e outros coronavírus de mamíferos, enquanto na década de 1960 foram identificados dois coronavírus humanos, 229E (HCoV-229E) e OC43 (HCoV-OC43). Entre os anos de 1960 e 2004 foram identificados sete novos coronavírus em mamíferos sendo eles coronavírus bovino (BCoV), vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (PHEV), vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV), coronavírus respiratório suíno (PRCV) e coronavírus felino (FCoV), além de coronavírus aviário (IBV) (WOO et al., 2009). Em 2002, foi identificado um novo coronavírus humano, o SARS-CoV, transmitido através da manipulação de animais ou alimentos na província de Guangdong, China. Durante o surto, com duração de 8 meses, foi confirmado a transmissão do vírus para 8.000 pessoas e a taxa de mortalidade registrada foi de 10% (SAHIN, 2020). Em 2004, o coronavírus NL63 foi identificado em um bebê na Holanda e, em 2005, o vírus HKU1 foi identificado em um idoso de Hong Kong (ABDUL-RASOOL, et al., 2010). Em 2012, um novo

coronavírus foi identificado na Arábia Saudita, causando a epidemia da Síndrome Respiratória do Oriente Médio, o MERS-CoV (YESUDHAS et al., 2020). Em dezembro de 2019, no mercado atacadista na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, foi identificado o SARS-CoV-2, vírus causador da pandemia de Covid-19 (YESUDHAS et al., 2020) (**Figura 2**).



**Figura 2:** Identificação dos coronavírus ao longo dos anos.

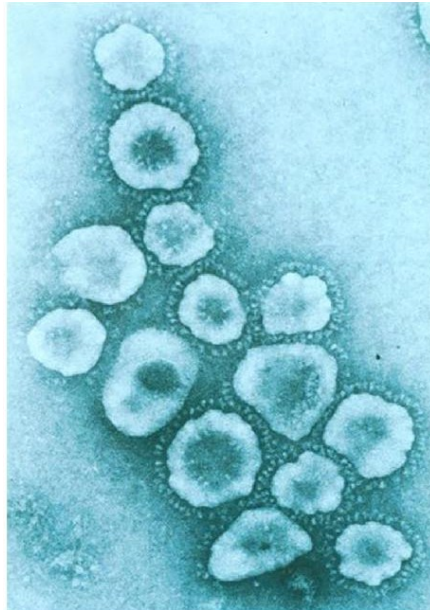
Nos últimos anos têm-se observado um aumento no número de coronavírus identificados e nos genomas sequenciados. Como resultado, identificou-se que alguns coronavírus apresentam homologia mesmo quando isolados em animais filogeneticamente distantes, como representado na **Figura 1**: coronavírus felino – FCoV junto ao CCoV (coronavírus canino) presentes no grupo 1a; vírus da hepatite murina – MHV próximo ao coronavírus humano - HCoV-OC43, coronavírus bovino - BCoV homólogo ao vírus da encefalomielite hemaglutinante suína - PHEV presentes no grupo 2a; coronavírus de morcego SARS-CoV próximo SARS-CoV humano no grupo 2b; o vírus da bronquite infecciosa – IBV próximo ao TCoV no grupo 3a; e o coronavírus de gato leopardo asiático próximo aos novos coronavírus aviários no grupo 3c (WOO et al., 2009). Essa homologia explicaria o salto entre espécies, gerando surtos de doenças zoonóticas.

Os coronavírus são divididos segundo a reatividade antigênica em quatro grupos: alfa, beta, gama e delta coronavírus. Causam doenças intestinais, síndromes respiratórias, neurológicas ou sistêmicas em diferentes animais, sejam eles domésticos ou selvagens, como também em humanos. Oriundos de morcegos, os *alfa* e *betacoronavírus* infectam predominantemente mamíferos, enquanto os *gama* e *deltacoronavírus*, provenientes de aves, são capazes de infectar diferentes espécies de aves e mamíferos (HAAKE et al., 2020).

O gênero *Betacoronavírus* possui quatro subgêneros, sendo o subgênero *Embecovirus* composto pelo Vírus da Hepatite Murina (MHV) e o *Sarbecovirus* composto pelo SARS-CoV e SARS-CoV-2 (KÖRNER et al., 2020).

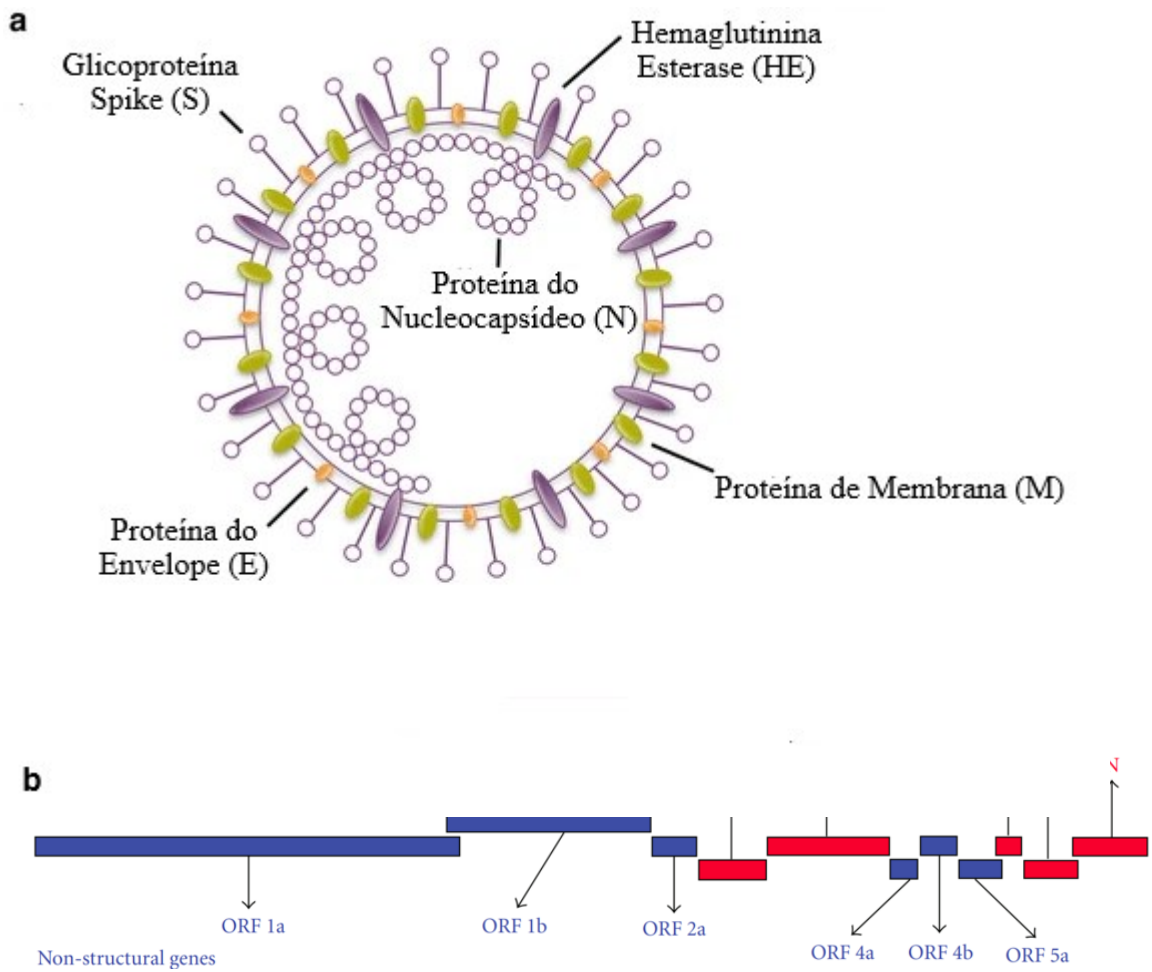
### 3.2 Vírus MHV

O Vírus da Hepatite Murina (MHV) é um *Betacoronavírus*, considerado um patógeno natural de camundongos. Possui de 60 a 200 nm de diâmetro, sendo também pleomórfico (**Figura 3**). Foi descrito pela primeira vez em camundongos albinos suíços por Cheever e colaboradores (1949) e isolado por Riet e Kahn, em 1973. O MHV possui genoma de RNA viral positivo de 30-32 Kb, que é transcrito em um conjunto de sete mRNAs subgenômicos. Esse genoma contém 11 fases de leitura abertas (*open reading frames*, ORFs), codificando duas réplicas de poliproteínas, três proteínas não estruturais de função desconhecida e seis proteínas estruturais: glicoproteína *spike* (S), glicoproteína transmembrana (M), proteína envelope (E), proteína hemaglutinina esterase (HE) e nucleocapsídeo (N) (**Figura 4 A**) (PHILLIPS; WEISS, 2011).



**Figura 3:** Partículas virais do MHV observadas em microscópio eletrônico (SARMA, 2010).

Entende-se que as proteínas estruturais codificadas pelo genoma do MHV sejam responsáveis pela patogênese do vírus. A proteína *spike* (S) é altamente glicosilada e têm projeção radial externa, formando uma coroa, originando o nome do vírus de coroa (coroa), cuja função é ligar o vírus a células hospedeiras. A glicoproteína transmembrana (M) e proteína envelope (E) desempenham papel na montagem do vírus, e a proteína I tem função desconhecida (**Figura 4B**) (SARMA, 2010).



**Figura 4:** **A:** Estrutura do coronavírus MHV com cinco proteínas estruturais: glicoproteína *spike* (S), proteína envelope (E), glicoproteína transmembrana (M), proteína nucleocapsídeo (N) e hemaglutinina-esterase (HE) (PERLMAN; WHEELER, 2016). **B:** Representação esquemática da organização genômica do vírus da hepatite de camundongos (SARMA, 2010).

O processo de infecção do MHV em camundongos se inicia pela entrada na célula hospedeira através da ligação da proteína S a receptores específicos localizados na superfície dessas células. O antígeno carcinoembriônico (CEA) é o receptor das células hospedeiras que, quando ligado à proteína S, desencadeia a fusão das membranas virais e plasmáticas (SARMA, 2010). Na sequência, o ciclo replicativo do vírus se dá no citoplasma das células infectadas usando a RNA polimerase dependente de RNA viral, levando à replicação do genoma viral (ADAMI et al., 1995).

O MHV possui cepas com tropismos variados, com diferenças na virulência e patologia. Em sua maioria, elas causam infecções não aparentes em camundongos, cuja gravidade é influenciada pela idade do animal, genótipo e condições imunológicas, causando de encefalite leve ao desenvolvimento de desmielinização e encefalite letal (PERLMAN; WHEELER, 2016). Apesar dos diferentes tropismos, todas as cepas do MHV utilizam o mesmo receptor celular para entrada; dessa forma, acredita-se que o fator determinante para o tropismo de cepas do MHV ocorra após a infecção viral (WEISS; LEIBOWITZ, 2011).

As cepas podem ser divididas em dois biotipos: politrópicos e enterotrópicos respiratórios baseados na classificação tecidual da infecção primária. De interesse em nosso trabalho, o grupo politrópico é empregado como modelo para doenças em humanos, pois fornecem modelo para doenças de diversos sistemas de órgãos (WEISS e LEIBOWITZ, 2011). Dessa forma, as cepas neurotrópicas de MHV (JHM, MHV-4) provocam encefalite aguda e doenças desmielinizantes crônicas, as cepas unicamente hepatotrópicas (MHV-2 e MHV-3) oferecem modelos animais para hepatite viral, e a cepa exclusivamente pneumotrópica (MHV-1) ocasiona pneumonite, enquanto MHV-A59 é moderadamente hepatotrópico e neurotrópico, causando hepatite viral e encefalite aguda (SARMA, 2010; WEISS; LEIBOWITZ, 2011).

A cepa MHV-3 usada para estudar a patogênese da hepatite induzida por MHV, foi isolada do fígado de camundongo em processo de desmame – VS, que desenvolveu hepatite aguda após infectado com soro de paciente com hepatite aguda. A cepa é considerada mais virulenta e ocasiona insuficiência hepática fulminante em camundongos suscetíveis; por esse motivo, é normalmente utilizada para estudar a patogênese da hepatite induzida pelo MHV (WEISS; LEIBOWITZ, 2011). A hepatite e a lesão celular causada pela infecção pelo MHV-3 ocorrem em decorrência da ativação da cascata de coagulação, desenvolvendo microtrombos nos sinusóides hepáticos (WEISS; LEIBOWITZ, 2011). Os monócitos e macrófagos envolvidos em respostas inflamatórias causadas pela infecção pelo MHV-3 expressam pró-coagulantes em sua superfície celular, fornecendo informações sobre o papel da atividade pró-coagulante, codificada pelo gene *fgl2* (POPE et al., 1995). Os sintomas clínicos causados em camundongos pela infecção pelo MHV-3 são análogos aos sintomas clínicos da insuficiência hepática fulminante em humanos, bem como a resposta inflamatória e disfunção pulmonar (KÖRNER et al., 2020; ANDRADE et al., 2021).

Camundongos infectados com o MHV-3 por inoculação intranasal apresentam manifestações clínicas similares àquelas da Covid-19. O recrutamento de leucócitos para o

tecido pulmonar no início da infecção pelo MHV-3 aumenta consideravelmente a porcentagem de neutrófilos, macrófagos e monócitos, iniciando uma resposta inflamatória robusta no local. Essa resposta eleva a concentração de mediadores inflamatórios, as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, e as citocinas TNF, IFN $\gamma$ , IL1- $\beta$  e IL-6. Quando a inflamação não é resolvida o vírus se espalha para outros órgãos, acontecendo a liberação desregulada de citocinas pró-inflamatórias, levando à tempestade de citocinas, ocasionando danos graves aos tecidos e órgãos hospedeiros, induzindo a morte de células inflamatórias e, por conseguinte, causando doença sistêmica e levando a falência múltipla dos órgãos, com manifestações similares às causadas pelo SARS-CoV-2 (ANDRADE et al., 2021; ZENG et al., 2021).

Portanto, o MHV-3 representa um modelo adequado para o estudo de infecções pelo SARS-CoV-2, com maior segurança e menor custo nos experimentos.

### **3.3 Histórico e epidemiologia do SARS-CoV-2**

Em dezembro de 2019, um vírus até então não identificado foi causador de surto da síndrome respiratória na cidade de Wuhan, China. Em 7 de janeiro de 2020, o Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças identificou-o como sendo o novo coronavírus 2019-nCoV. Após um mês do primeiro caso relatado, 34 províncias da China registraram casos confirmados e o pico atingiu média diária de mais de 3.000 casos (HU et al., 2020). Medidas restritivas e de contenção foram realizadas para barrar a transmissibilidade do vírus, incluindo *lockdown*, com o fechamento do comércio não essencial, aeroportos, rodovias e cidades. Ainda em janeiro de 2020, os Ministérios da Saúde da Tailândia, Japão e Coreia relataram seus primeiros casos confirmados, todos oriundos de Wuhan. Até o final de janeiro daquele ano, 10 países, distribuídos em todos os continentes confirmaram seus primeiros casos de transmissão local (MURALIDAR et al., 2020). Então, em 30 de janeiro de 2020 a OMS declarou emergência em saúde pública de interesse internacional (PHEIC). Em fevereiro de 2020, o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus - ICTV denominou o novo coronavírus de SARS-CoV-2, e a OMS denominou a doença causada pelo vírus de Covid-19 (doença causada por coronavírus, ano 2019).

Tendo em vista os números elevados de casos na China e a confirmação de mais de 118.000 casos em 114 países com mais de 4.000 óbitos (**Figura 5**), em 11 de março de 2020 a OMS declarou a pandemia da Covid-19 (**Figura 5**) (OLIVEIRA, 2020).

No Brasil, o primeiro caso confirmado ocorreu em 26 de fevereiro de 2020. Rapidamente o vírus se disseminou por todo o país saturando o sistema público de saúde e em 13 de março o primeiro caso confirmado de transmissão local foi registrado, sendo o primeiro óbito por covid-19 registrado em 17 de março (Secretaria de Vigilância em Saúde | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Um ano após a confirmação do primeiro caso, o Brasil já registrava 10.517.232 casos e 254.221 óbitos por covid-19. Até 08 de setembro de 2025 o Brasil registrou 39.318.227 casos confirmados de Covid-19 e mais de 716.626 óbitos, colocando-o em segundo lugar no ranking mundial (Secretaria de Vigilância em Saúde | MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2025).

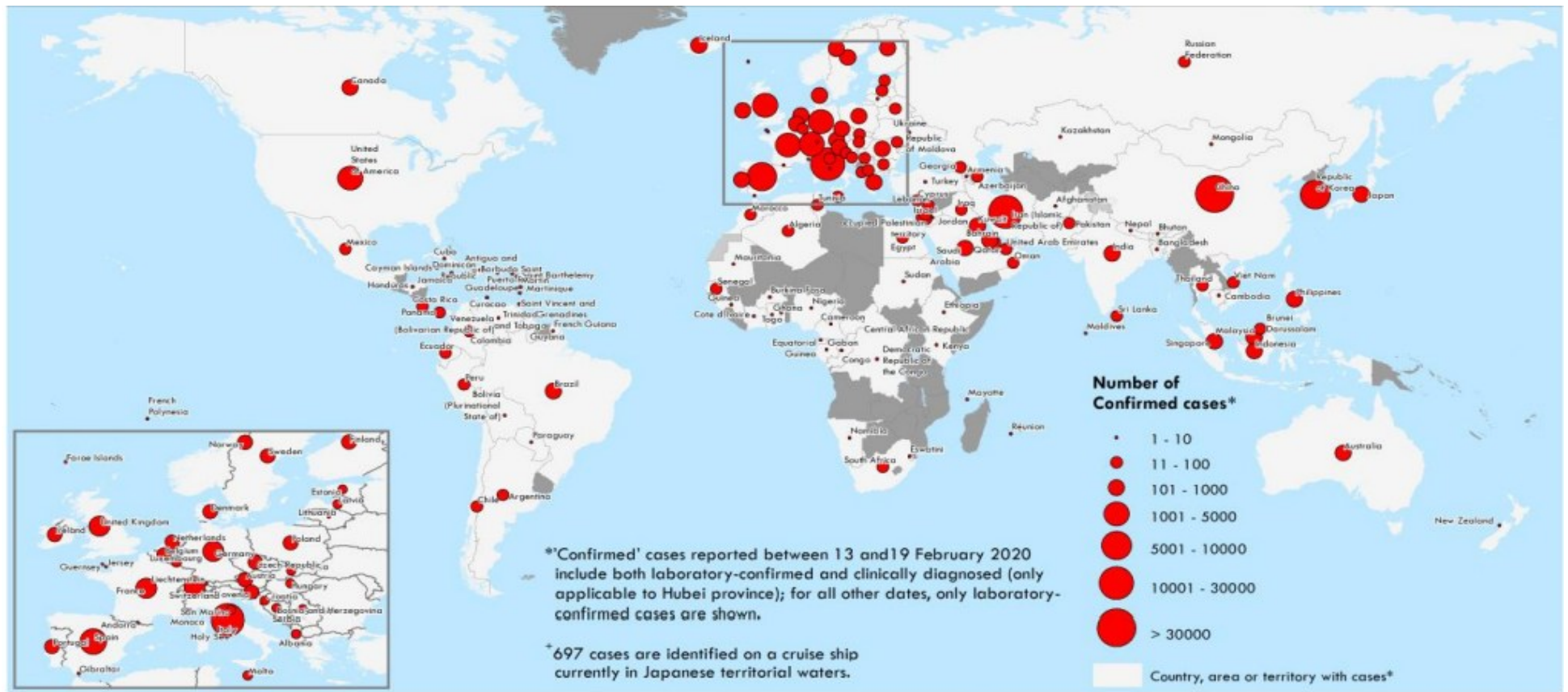


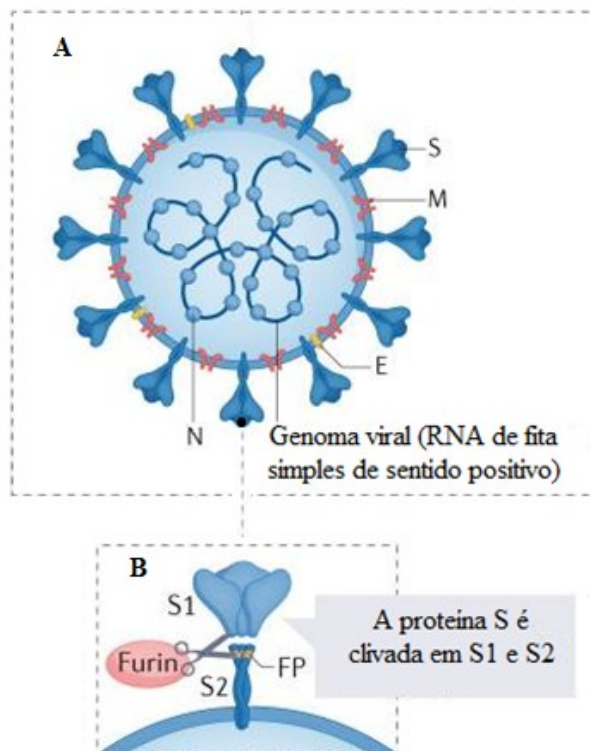
Figura 5: Distribuição de casos confirmados em março de 2020 (OMS, 2020).

### 3.4 Genoma e ciclo de replicação viral do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um *Betacoronavirus* pertencente ao subgênero *Sarbecovirus*. Análises filogenéticas demonstraram que o SARS-CoV-2 compartilha 79% de identidade do seu genoma completo com o SARS-CoV, 87,6% do CoV de morcegos (ZC45 e ZXC21), 91,02% com o CoV de pangolins, o Pangolin-CoV, e 50% com o MERS-CoV, vírus causador dos surtos em 2002 na China e em 2012 no Oriente Médio (REN et al., 2020; HARRISON et al., 2020; CHAN et al., 2020).

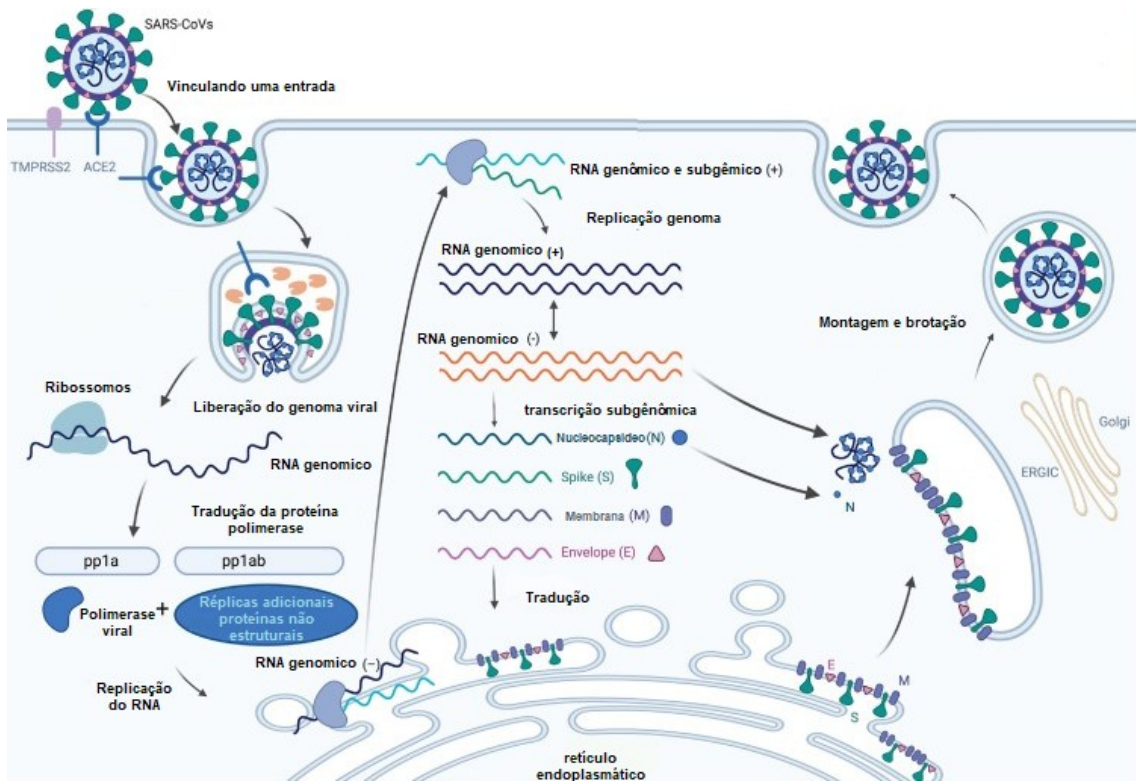
O SARS-CoV-2 possui um diâmetro de 60 a 140 nm e *spikes* variando de 9 a 12 nm, se assemelhando a uma coroa solar (**Figura 6A**) (WIERSINGA et al., 2020). Possui RNA de fita simples, sentido positivo. Seu genoma possui 14 fases de leitura aberta (do inglês *open reading frame*) (ORFs), os quais codificam 16 proteínas não estruturais, nove proteínas acessórias (ORF) e quatro proteínas estruturais: *Spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), sendo a glicoproteína *Spike* responsável pela entrada do Sars-CoV-2 em células hospedeiras, e as proteínas E e M responsáveis pela montagem do vírus (**Figura 6A**) (HARRISON et al., 2020).

A glicoproteína *Spike* (S) possui domínios N-terminal e C-terminal. Para iniciar o processo de infecção, a entrada do vírus nas células hospedeiras é mediada por esta glicoproteína, a qual compreende duas subunidades funcionais, S1 e S2 (**Figura 6B**) (MORSE et al., 2020). A subunidade S1 tem como função se ligar à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) da célula hospedeira, enquanto a subunidade S2 tem como função fixar a proteína S à membrana, bem como mediar a fusão da membrana logo após a infecção de uma nova célula, por possuir um peptídeo de fusão (JACKSON et al., 2022). Além da ECA2, o processo de entrada do vírus na célula do hospedeiro envolve a interação com a Protease Transmembrana Serina 2 (TMPRSS2) (AGONDI et al., 2020).



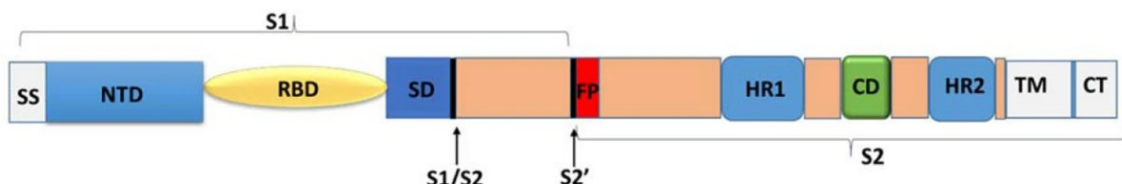
**Figura 6:** (A) Proteínas estruturais do SARS-CoV-2: Spike (S), envelope (E), membrana (M) proteínas nucleocápsidas (N) (B) subunidades funcionais, S1 e S2. Adaptado de JACKSON et al. (2022).

Após a fusão do envelope viral à membrana plasmática da célula, o vírus introduz seu RNA dentro da célula hospedeira (**Figura 7**). Dessa forma, o RNA será traduzido pelos ribossomos celulares, dando origem a diversas proteínas virais, sendo a replicase viral a primeira delas, replicando o material genético do vírus. A replicação e transcrição do genoma do coronavírus ocorre dentro do retículo endoplasmático; todavia, para que o vírus seja totalmente formado é necessária outra organela, o complexo de Golgi. Dentro do complexo de Golgi, o vírus é então formado e ativado pela proteína furina e, em seguida, o vírus é excretado através de vesículas (MOUSAVIZADEH e GHASEMI, 2021).



**Figura 7:** Ciclo de multiplicação viral do SARS-CoV-2. Adaptado de Harrison et al. (2020).

A similaridade da sequência da glicoproteína Spike do SARS-CoV e do SARS-CoV-2 é de 75 a 78% (YESUDHAS et al., 2021). Somente a glicoproteína Spike possui um domínio de ligação receptora (RBD) com semelhança de 73 a 76% entre eles, justificando a ligação de ambos os vírus com o mesmo receptor celular, a ECA2 da célula hospedeira (HARRISON, et al., 2020; YESUDHAS et al., 2021). Quando uma das subunidades S1 ou S2 se ligam aos receptores hospedeiros elas atuam como um domínio de ligação receptora (RBD) (**Figura 8**).



**Figura 8:** Sequência da proteína Spike do SARS-CoV-2. Domínio de ativação de terminal NTD, domínio de ligação do receptor RBD, subdomínio SD (YESUDHAS et al., 2020).

Os receptores ECA2 estão presentes em células do rim, nos vasos sanguíneos, coração e pulmão, em células alveolares do tipo 2 (AT2) e em células epiteliais do trato respiratório alveolar (YESUDHAS et a., 2020).

O SARS-CoV-2 é considerado menos agressivo do que o SARS-CoV, mas possui maior transmissibilidade. O genoma viral do SARS-CoV-2 codifica a protease 3CL<sup>pro</sup> importante na produção de proteínas virais e no controle da atividade do complexo de réplicas; essa enzima é fundamental para a replicação e infecção do vírus, tornando-se um alvo para a produção de agentes antivirais (CHOJNACKA et al., 2020).

### 3.5 Transmissão e profilaxia

Acredita-se que o SARS-CoV-2 seja oriundo de mamíferos da ordem Chiroptera (morcegos) e transmitido a hospedeiros amplificadores, como os animais silvestres. Com o consumo dessas espécies, o vírus foi transmitido a humanos (OLIVEIRA et al., 2020). A transmissão entre humanos ocorre através da inalação de partículas virais contidas em gotículas e aerossóis expelidas por pessoas infectadas assintomáticas ou sintomáticas (SALZBERGER et al., 2020). Gotículas são depositadas nas vias aéreas superiores, enquanto aerossóis são capazes de penetrar nas vias aéreas inferiores e sedimentar-se em alvéolos (HARRISON et al., 2020). Um indivíduo contaminado transmite o vírus para outro ao estar em contato durante pelo menos 15 minutos, em um espaço de 1,80 metros (WIERSINGA et al., 2020).

A transmissão também ocorre pelo contato com superfícies contaminadas pelo vírus. A carga viral permanece por maior tempo em superfícies impermeáveis, por até 3 a 4 dias após contaminação, do que em superfícies permeáveis. Todavia, a quantidade de vírus detectada nas superfícies é reduzida dentro de 48 a 72 horas (WIERSINGA et al., 2020).

No intuito de conter a transmissão, foi recomendado pela OMS o uso de máscaras cobrindo boca e nariz, distanciamento físico de 1,5 metros, higienização das mãos e áreas contaminadas com álcool a 70%, hipoclorito a 2% e/ou sabão. Para os profissionais da saúde que estavam na linha de frente, foi recomendado o uso de máscaras N95, *face shield* e aventais descartáveis.

### 3.6 Patogênese e resposta imune

A patogênese do SARS-CoV-2 vai desde sintomas leves, semelhante a resfriados, até a síndrome respiratória aguda grave, que pode levar a óbito. Sintomas como febre, dor de garganta, tosse seca, diarreia, perda de olfato e paladar, fadiga, dor de cabeça e dispneia podem

surgir no período de 3 a 7 dias após infecção pelo vírus (WOODBYP et al., 2020; MAJUMDER; MINKO, 2021). O período de incubação varia de 2-11 dias (HARRISON et al., 2020).

As células epiteliais nasais são as primeiras a serem infectadas devido à maior expressão da ECA2, enquanto a infecção do trato respiratório inferior é decorrente da replicação viral, permitindo a infecção das células epiteliais alveolares dos pulmões, causando pneumonia (WOODBYP et al., 2020; HU et al., 2020). A pneumonia causada pelos HCoV-2 decorre da rapidez com que o vírus é replicado, levando à infiltração maciça de células inflamatórias e produção elevada de citocinas e quimiocinas, ocasionando lesão pulmonar aguda e síndrome respiratória aguda grave (CHANNAPPANAVAR; PERLMAN, 2017).

A inflamação do parênquima pulmonar decorrente da infecção pelo SARS-CoV-2 é coordenada temporalmente e espacialmente pela resposta imune, composta por células mononucleares e poliformonucleares, através da liberação de citocinas no intuito do retorno da homeostase (OLIVEIRA et al., 2021). Citocinas e quimiocinas exercem um papel importante na imunidade e imunopatologia durante infecções por vírus. Uma resposta imune inata rápida e bem coordenada é a primeira linha de defesa contra infecções virais. Iniciada a resposta imune inata, ocorre a ativação de interferons do tipo I, induzindo a expressão de diferentes genes que são capazes de inibir diretamente a replicação viral até o recrutamento, ativando outras células do sistema imune (OLIVEIRA et al., 2020).

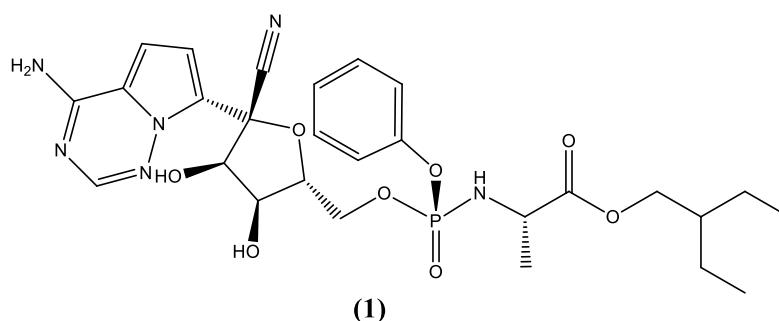
Todavia, uma ineficácia de mecanismos do processo de resolução da inflamação leva a infiltração celular no tecido inflamado, pela produção exacerbada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, ocasionando o fenômeno conhecido de “tempestade de citocinas” (do inglês *cytokine storm*). Assim, a liberação desregulada dos mediadores é responsável pela lesão tecidual e sistêmica decorrente da inflamação pulmonar, ocasionando casos clínicos de sepse viral, pneumonia viral letal e síndrome respiratória aguda grave. Para além, colabora para incidência de comprováveis danos neurais, hepáticos e cardiovasculares e infecções secundárias (CHANNAPPANAVAR e PERLMAN, 2017; PARASHER, 2020).

### **3.7 Abordagens terapêuticas antivirais disponíveis**

Abordagens terapêuticas baseadas em antivirais eficazes contra SARS-CoV-2 são primordiais para o tratamento de infecções. Fármacos previamente existentes, ativos frente a outros patógenos, foram avaliados para tratamento. Em 2020, o remdesivir, fármaco ativo

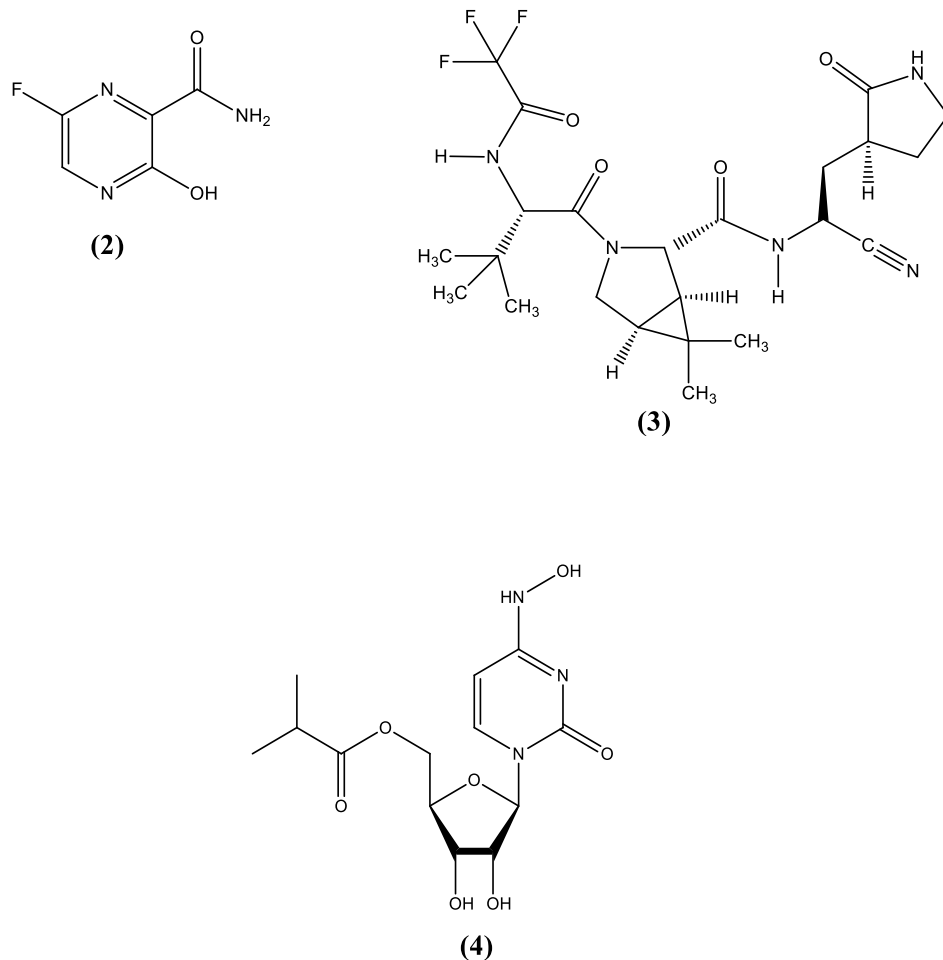
contra o vírus Ebola e infecções pelo vírus Marburg foi utilizado em diferentes países. Inicialmente a Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) aprovou seu uso emergencial, seguida pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (GAVRIATOPOULOU et al., 2020) (MAJUMDER; MINKO, 2021) No Brasil, uso do remdesivir para tratamento da Covid-19 foi aprovado em março de 2021 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Além disso, um estudo randomizado, iniciado em setembro de 2021 e conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais, foi desenvolvido com o objetivo de avaliar, de forma quantitativa, os efeitos do remdesivir em pacientes de baixo risco com altas cargas virais de SARS-CoV-2. Esse estudo, realizado no âmbito da plataforma PLATCOV (NCT05041907), indicou que o remdesivir promoveu uma aceleração significativa da depuração viral em pacientes com infecção aguda por SARS-CoV-2, apresentando, além disso, perfil de segurança favorável (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home>).

O remdesivir (**1**) é um pró-fármaco análogo da adenosina que é metabolizado intracelularmente em um nucleosídeo trifosfato ativo (NTP), o qual inibe o RdRp viral e dessa forma interrompe o processo de replicação do genoma viral (ŞİMŞEK-YAVUZ et al., 2021). Possui atividade de amplo espectro contra várias famílias de vírus (GREIN et al., 2020). Foi desenvolvido em 2017 para o tratamento de infecção pelos vírus Ebola e Marburg pela *Gilead Sciences* (GAVRIATOPOULOU et al., 2020). Em estudos iniciais, mostrou eficácia profilática e terapêutica em modelos não clínicos de infecções causadas pelo MERS-CoV e SARS-CoV, bem como em testes *in vitro* de atividade contra o SARS-CoV-2 (ŞİMŞEK-YAVUZ et al., 2021).



O favipiravir (**2**) é um inibidor de polimerase de RNA usado como fármaco antiviral contra diferentes tipos de infecções por vírus RNA. Seu uso emergencial foi aprovado para tratamento da Covid-19 pela agência reguladora na China. Além dos antivirais relatados anteriormente, as agências reguladoras de saúde aprovaram o uso do Paxlovid, que é uma

associação do nirmatrelvir **(3)**, um inibidor de protease de segunda geração, e ritonavir, um fármaco que retarda a metabolização do nirmatrelvir, intensificando seu efeito farmacológico (LAMB, 2022), e do molnupiravir **(4)** como agentes antivirais para Covid-19 (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-oral-antiviral-treatment-covid-19-adults>).



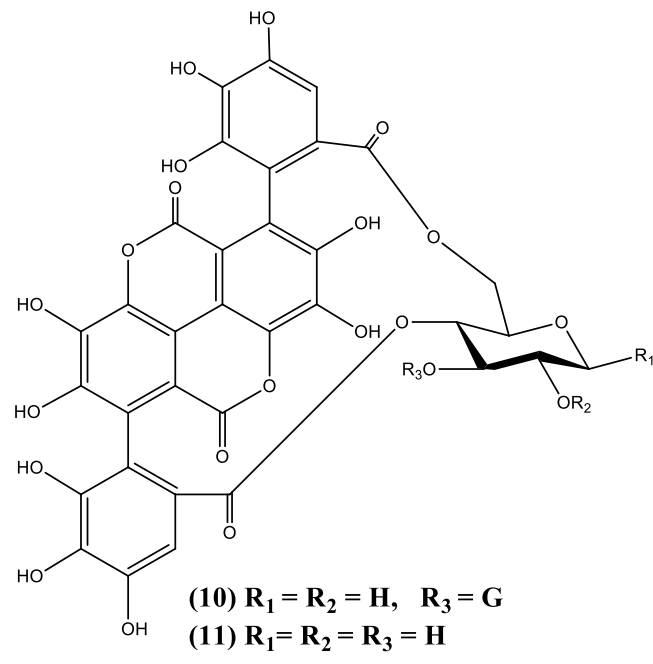
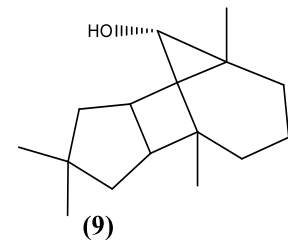
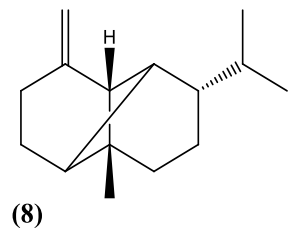
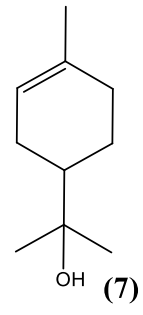
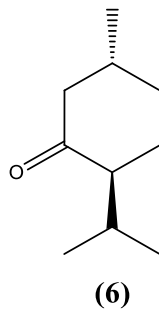
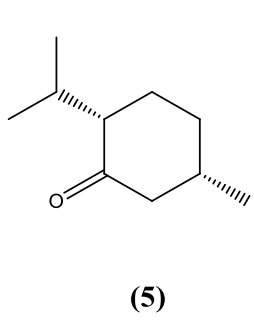
### 3.8 Gênero *Terminalia* Linnaeus

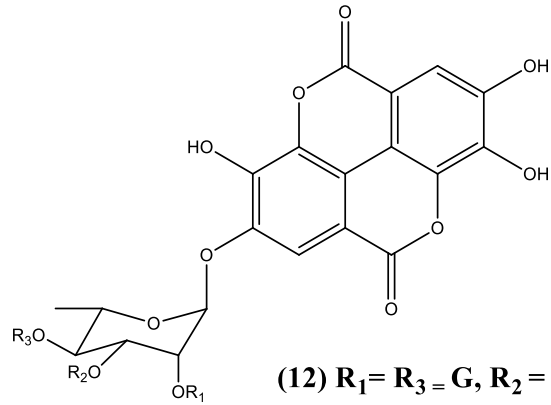
Pertencente à família Combretaceae, as espécies do gênero *Terminalia* são endêmicas em países tropicais e subtropicais, predominantemente na Ásia, África, Oceania e América (GOMES et al, 2020). Atualmente mais de 250 espécies foram identificadas em todo o mundo. Suas árvores e arbustos são de médio e grande porte, atingindo até 75 metros de altura (FAHMY et al., 2015). Do latim *terminius* significa “folhas localizadas na ponta do ramo” (ZHANG et al., 2019).

Até o momento, mais de 50 espécies do gênero foram estudadas; desse total, 39 já foram relatadas por possuírem diferentes propriedades terapêuticas e nutricionais (FAN et al., 2015; ZHANG et al., 2019), bem como para fins medicinais, sendo empregadas na medicina tradicional chinesa, medicina tibetana e na medicina ayurvédica indiana (ZHANG et al., 2019).

Na medicina ayurvédica, espécies de *Terminalia* são empregadas para tratar doenças periodontais, virais, gastrointestinais, úlceras crônicas, infecções fúngicas da pele, leucorreia, como estimulador de memória e tônico cerebral (AFHARISHARI et al., 2016). Estudos demonstram que *Terminalia arjuna* apresenta atividade antiviral, destacando-se sua ação contra o vírus Herpes simplex tipo 2 (HSV-2), na qual extratos da espécie foram capazes de reduzir a replicação viral (CHENG et al., 2002). *Terminalia chebula* possui propriedades antimicrobiana e anticariogênica, atividade anti-inflamatória, antidiabética, antioxidante e hepatoprotetora (GUPTA et al., 2013), sendo indicada para tratar câncer, paralisia, hanseníase, úlceras, artrite, epilepsia, tosse, febre, diarreia, gastroenterite, distúrbios da pele, infecção do trato urinário e infecções por feridas (LEE et al., 2011; PINGALI et al., 2020).

Desde a década de 1930 o gênero *Terminalia* vem sendo estudado. Estudos químicos do gênero relatam a presença de mais de 368 constituintes: 104 terpenos: isomentona, (-) pulegone,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -copaeno e  $\beta$ -cariofileno (**5-9**); 91 taninos: arjunina, punicalina, 4-*O*-(2'',4''-di-*O*-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) ácido elágico, 4-*O*-(4''-*O*-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) ácido elágico e 4-*O*-(3'',4''-di-*O*-galoil- $\alpha$ -L-ramnosil) ácido elágico (**10-14**); 44 flavonoides: 5,7,2'-tri-*O*-metilflavanona-4'-*O*- $\alpha$ -L-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicosídeo, arjunona e flavonona (**15-17**); 26 lignanas: 18. termilignana, anolignana B e terminalosídeo M (**18-20**); 52 fenóis e glicosídeos: ácido brevifolincarboxílico, 4-*O*- $\beta$ -D-(6'-*O*-galoil) glicosídeo, 3-*O*-galoil-Dglicose e ácido vanílico (**21-25**), 6 esteróis e glicosídeos cardíacos: ácido protocatecuico,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol-3-acetato, palmitato de  $\beta$ -sitosterila, estigmasterol 3-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo, estigma-4-eno-3-ona, 16,17-diidroneridienona 3-*O*- $\beta$ -D-glicosil-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -D-galactosídeo, canogenol e 3-*O*- $\beta$ -D-galactosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo (**26-33**); 9 polióis: gluconolactona, metoxicarboniloximetil metilcarbonato, acetato de citronelila e laxiflorina (**34-37**) (LIU et al., 2009; SUBRAMANIAM et al., 2011; AFSHARI et al., 2016; ZHANG et al., 2019; PINGALI et al., 2020; DAS et al., 2020).

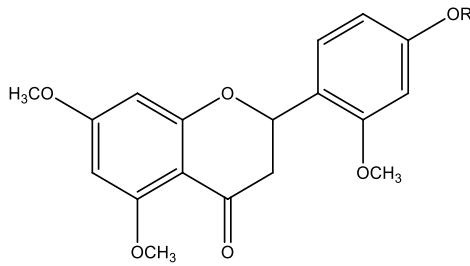




(12)  $R_1 = R_3 = G, R_2 = H$

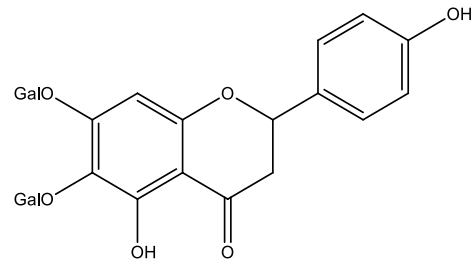
(13)  $R_1 = R_2 = H, R_3 = G$

(14)  $R_1 = H, R_2 = R_3 = G$

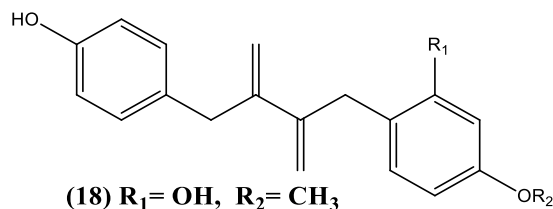


(15)  $R = \text{Glc (4-1)Rha}$

(16)  $R = \text{CH}_3$

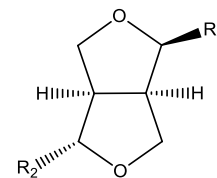


(17)

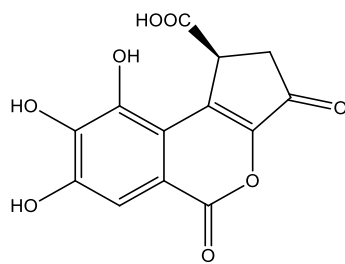


(18)  $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CH}_3$

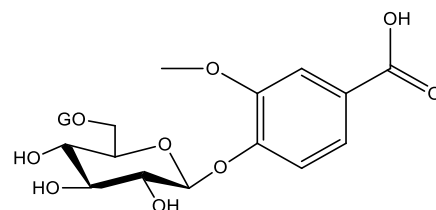
(19)  $R_1 = R_2 = \text{H}$



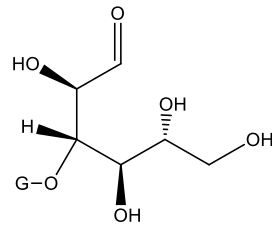
(20)  $R_1 = \text{Ar}_{10}, R_2 = \text{Ar}_2$



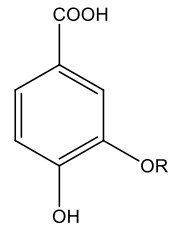
(21)  $R_1 = R_3 = \text{H}$



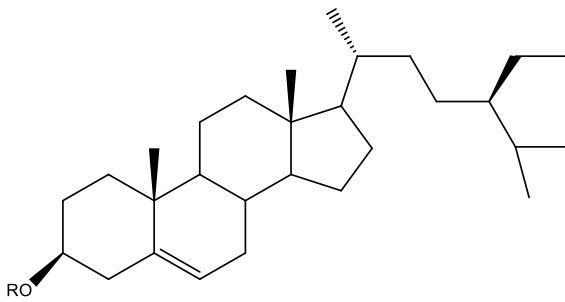
(22)



(23)

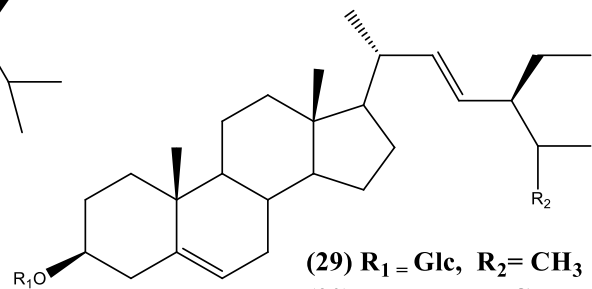
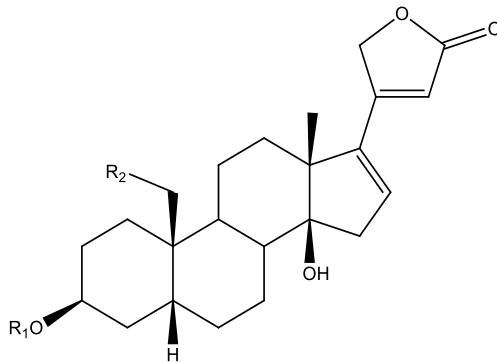
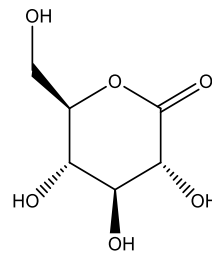
(24) R = CH<sub>3</sub>

(25) R = H

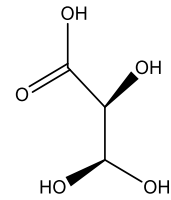


(26) R = H

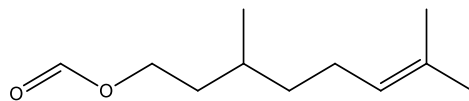
(27) R = OAc

(278) R = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>(29) R<sub>1</sub> = Glc, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>(30) R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>(31) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H(32) R<sub>1</sub> = Glc(1-6)Glc, R<sub>2</sub> = H(33) R<sub>1</sub> = Gal(1-4) Rha, R<sub>2</sub> = OH

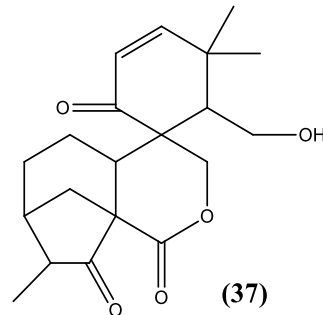
(34)



(35)



(36)



(37)

### 3.9 Espécies de *Terminalia* com atividade antiviral

O gênero *Terminalia* tem sido amplamente investigado quanto às suas atividades biológicas, incluindo potenciais efeitos antivirais demonstrados em ensaios *in vitro* e *in vivo* com extratos de diferentes espécies (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** Espécies de *Terminalia* com atividade antiviral.

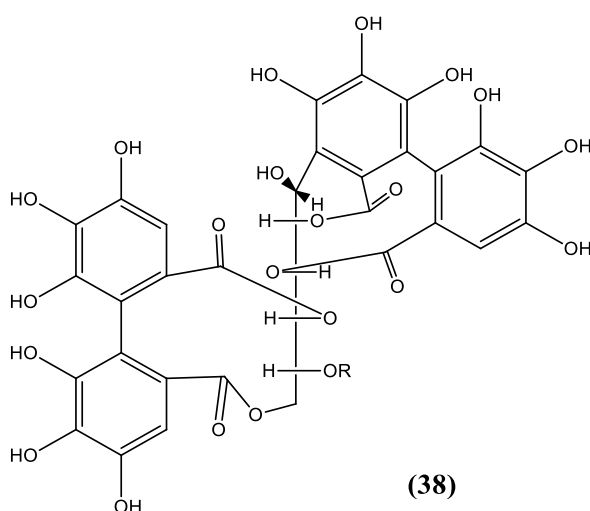
<i>Terminalia</i> spp	Extrato	Parte da planta	Vírus	Referências
<i>T. chebula</i>	Aquoso	Fruto	Hepatite B	Kim et al., 2001.
<i>T. arjuna</i>	Acetona/H <sub>2</sub> O (4:1)	Casca	HSV-2	Cheng et al., 2002
<i>T. ivorensis</i>	Aquoso	Folha	Ecovírus	Ogbole et al., 2018.
<i>T. chebula</i>	Metanólico	Casca	NDV	Lee, 2011.
<i>T. bellirica</i>	Etanólico	Fruto	DENV	Panya et al., 2021.
<i>T. chebula</i>	Etanólico	Fruto	HSV-2	Kesharwani et al., 2017
<i>T. chebula</i>	-	-	IAV	Li et al., 2020
<i>T. bellerica</i>	Etanólico	Cascas do fruto	HIV-1	Valsaraj et al., 1997
<i>T. sericea</i>	Clorofórmio, acetato de etila, água e acetona a 70%	Raízes	HIV-1	Tshikalange et al., 2008
<i>T. chebula</i>	Aquoso	Sementes	TBEV	Solovarov et al., 2019
<i>T. chebula</i>	Aquoso	Sementes	H3N2 H3N8	Oyuntsetseg et al., 2014

**Legenda:** **HSV-2:** Herpes Vírus simples 2; **NDV:** Vírus da Doença de Newcastle; **DENV:** Vírus da Dengue; **IAV:** Vírus da Influenza A; **HIV-1:** vírus da imunodeficiência humana

adquirida; **TBEV**: Vírus da encefalite transmitida por carrapatos; **H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>**: Variante do Vírus da Influenza A; **H<sub>3</sub>N<sub>8</sub>**: Variante do Vírus da Influenza A.

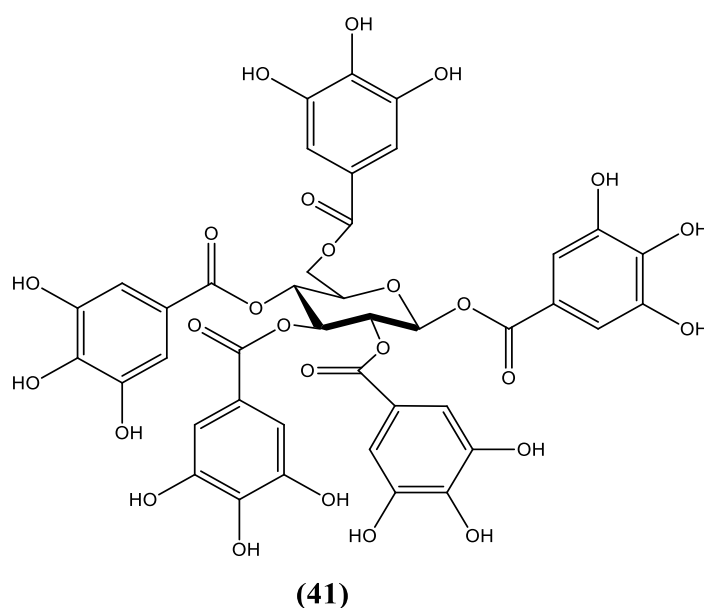
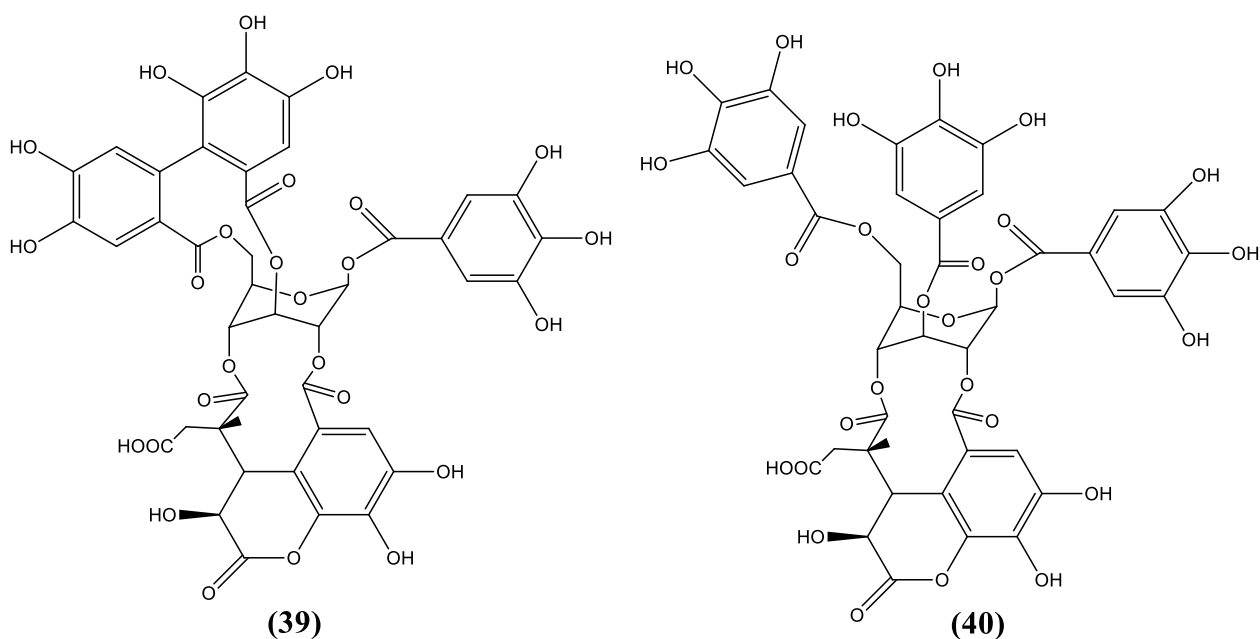
A seguir são descritas substâncias isoladas de diferentes espécies do gênero com potencial atividade antiviral demonstradas em ensaios *in vitro* e *in silico*.

A casuarinina (**38**) é um tanino hidrolisável isolado da casca de *Terminalia arjuna* Linn. Em ensaio *in vitro*, mostrou potente atividade virucida inibindo a proliferação do Vírus de Herpes Simples tipo 2 (HSV-2) na concentração de 25 µM, como também atividade antiviral após 12 h de infecção viral (CHENG et al., 2002).

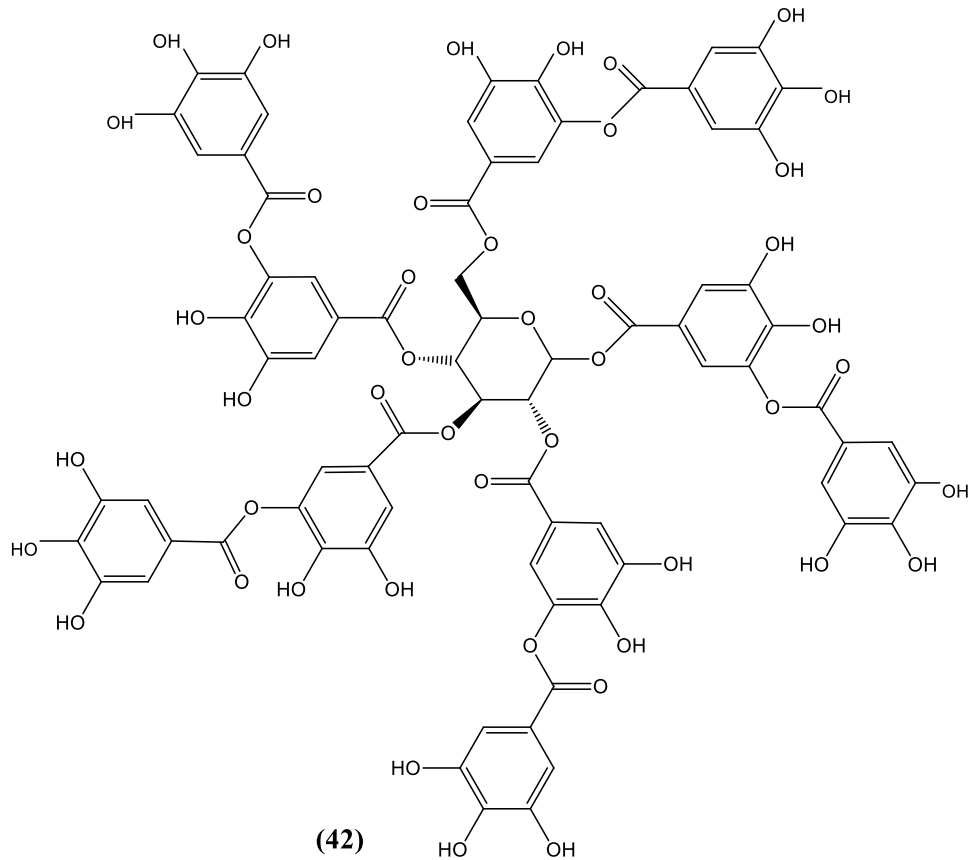


Dois outros taninos hidrolisáveis, ácido chebulágico (**39**) e ácido chebulínico (**40**) isolados da *T. chebula*, apresentaram atividade antiviral frente ao HSV-2, atuando na interação com glicoproteínas da superfície viral, alterando sua função ou tornando as partículas do vírus inertes, impedindo a fixação e proliferação do vírus nas células hospedeiras (KESHARWANI et al., 2017).

Nos ensaios *in silico* dois taninos hidrolisáveis, o ácido chebulágico (**39**) e a 1,2,3,4,6-pentagalactoglicose (**41**), isolados de *T. chebula*, apresentaram potencial inibitório frente ao vírus da hepatite C (HCV), atuando por interação com a protease viral NS3/4A, enzima essencial para o processamento das poliproteínas e replicação do vírus (PATIL et al., 2022). Ainda em estudos *in silico*, ambos os compostos formaram interações estáveis com os resíduos catalíticos da tríade ativa (His1057, Asp1081 e Ser1139), sugerindo um possível mecanismo de inibição enzimática (PATIL et al., 2022).

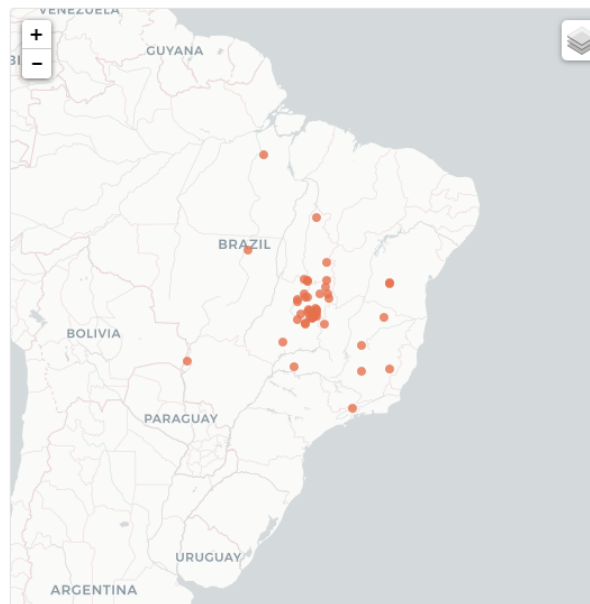


Ainda em ensaio *in silico*, o ácido tânico (42) isolado da *T. arjuna* apresentou alta afinidade com resíduos hidrofóbicos ARG 283, GLU 44, GLY 28 e VAL 46 da proteína envelope do vírus da Zika (PDB 5JHM). Esta ligação poderia suprimir o processo de dimerização e fusão de membrana, inibindo a entrada do vírus nas células hospedeiras e impedindo a interação da célula hospedeira com a proteína envelope ZIKV (PRIYA et al., 2018).



### 3.10 *Terminalia phaeocarpa* Eichler

A espécie *T. phaeocarpa* é endêmica no Brasil e ocorre predominantemente nos biomas da Mata Atlântica e Cerrado (**Figura 9**), sendo popularmente conhecida como capitão-da-mata ([sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/terminalia\\_phaeocarpa](http://sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/terminalia_phaeocarpa)).



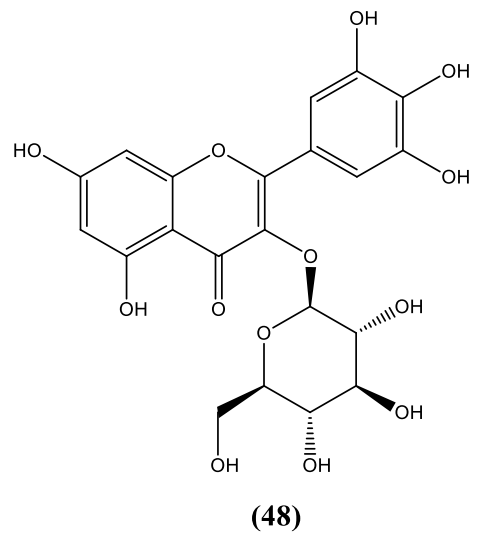
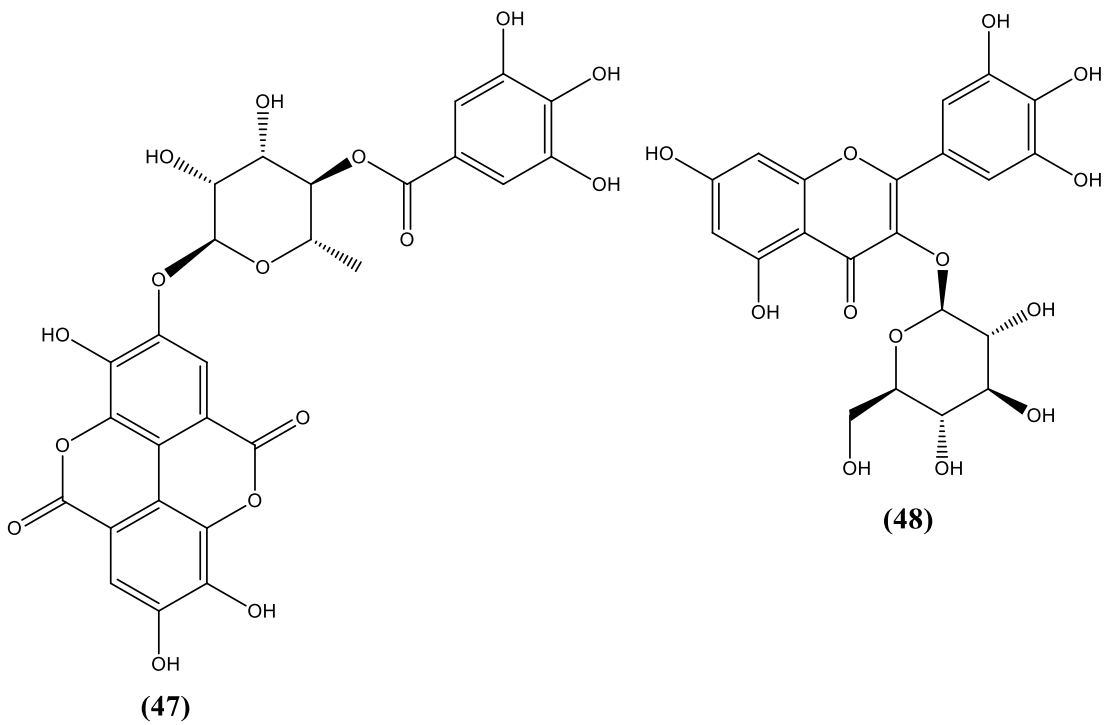
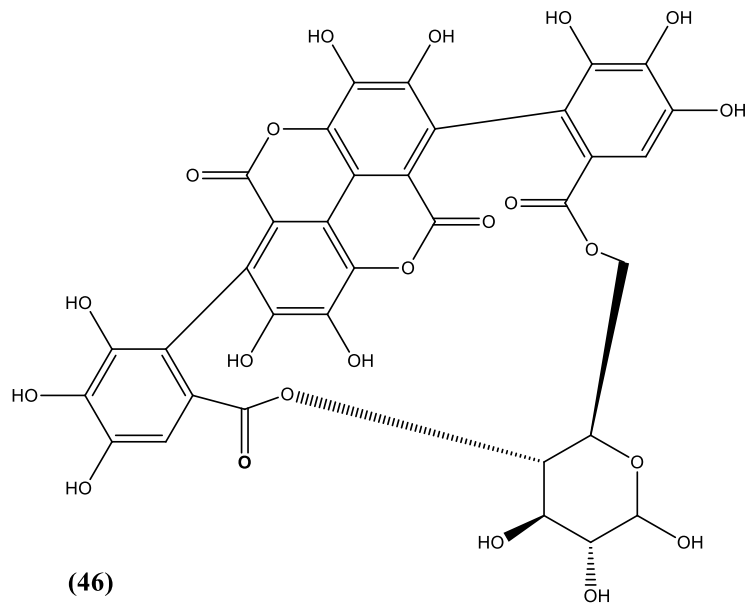
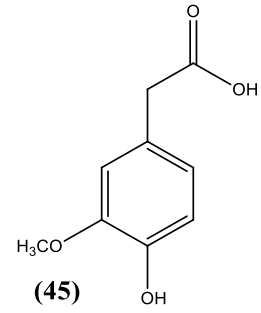
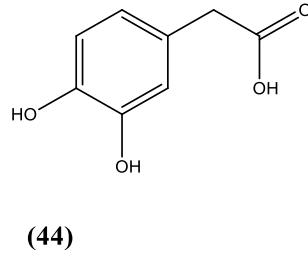
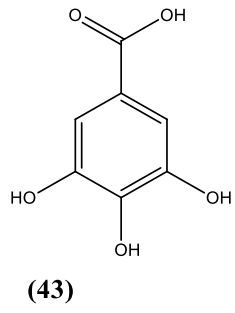
**Figura 9:** Registro de ocorrência da *T. phaeocarpa* no Brasil (SIBBR, 2023).

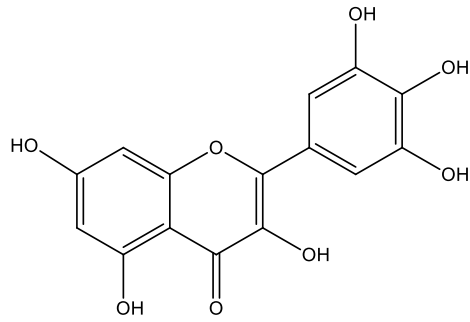
É uma espécie arbórea, com altura média de 8 a 10 metros, e tronco com diâmetro de 94 a 97 centímetros (**Figura 10A**). Apresenta folhas alternadas simples (**Figura 10B**); as flores expostas na extremidade dos ramos possuem coloração amarela clara (**Figura 10B**), seus frutos são verdes, possuindo em média 8 centímetros de comprimento e endocarpo (**Figura 10C**).



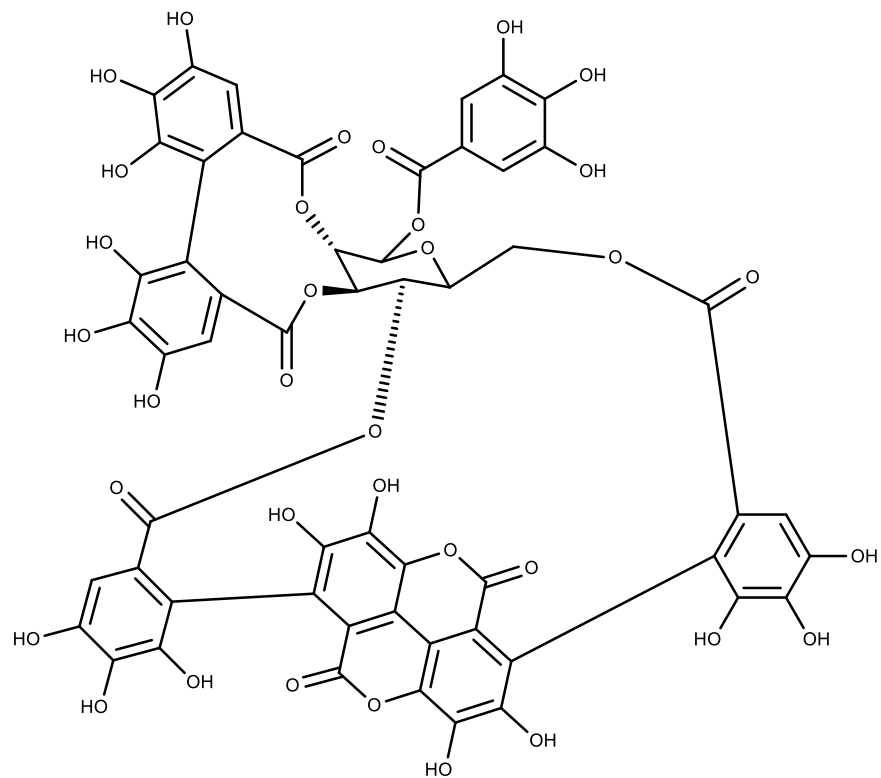
**Figura 10:** Morfologia de *T. phaeocarpa*. Árvore (A), folhas e flores (B) frutos e endocarpo (C). Autoria própria.

Trata-se de uma espécie pouco estudada até o momento. Não foram encontradas na literatura descrições do uso tradicional da espécie. Análise da composição química de folhas de *T. phaeocarpa* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massas possibilitou identificar putativamente 38 constituintes, incluindo ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido 3,4,-diidroxifenilacético, ácido 4-hidroxi-3-etoxifenilacético (**43, 44, 45**) elagitaninos: punicalina e ácido 4-O-3(3'', 4''-di-O-galoil- $\alpha$ -Lramnosill) elágico (**46, 47**) flavonoides: mirecetina glicosídeo e miricetina (**48, 49**) e um tanino:  $\alpha$ -galoil-pinicalagina (**50**) GOMES et al., 2021).





(49)



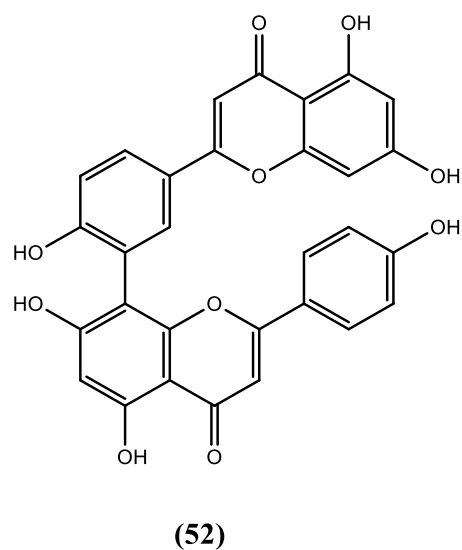
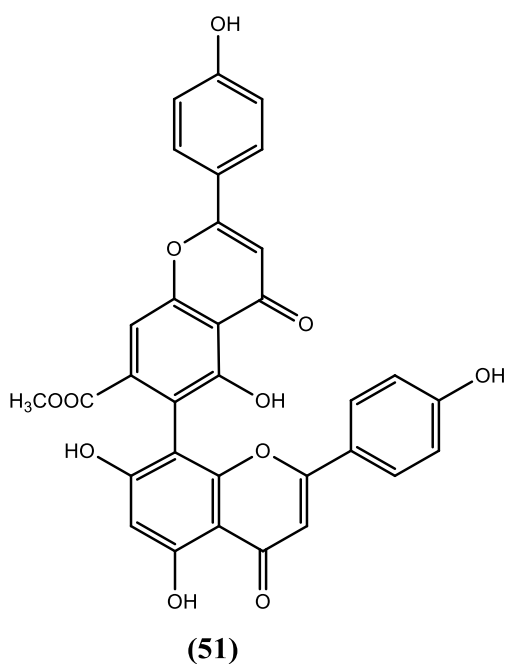
(50)

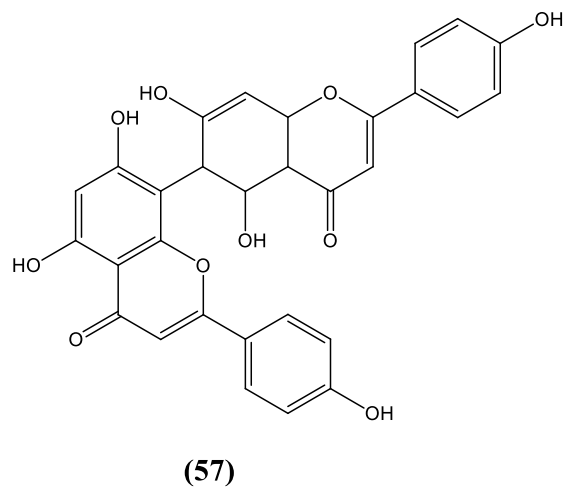
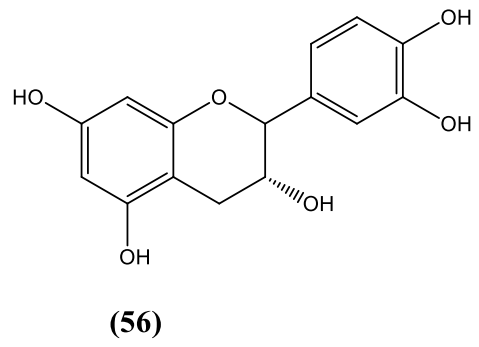
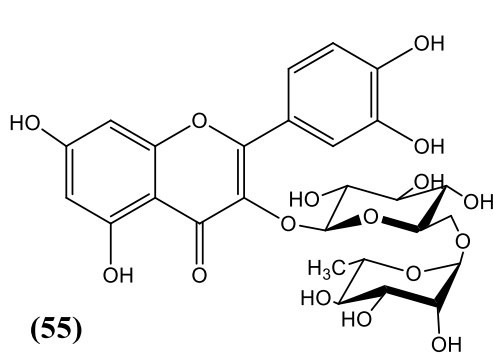
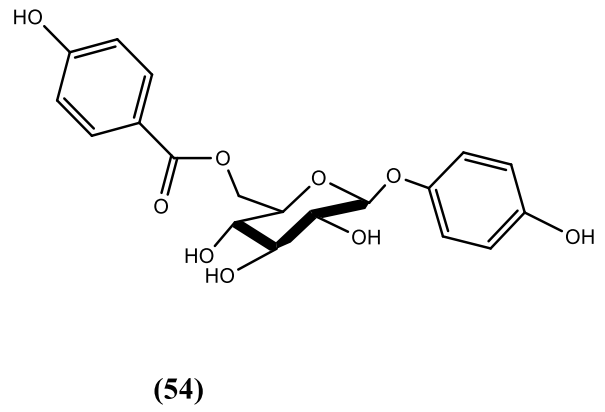
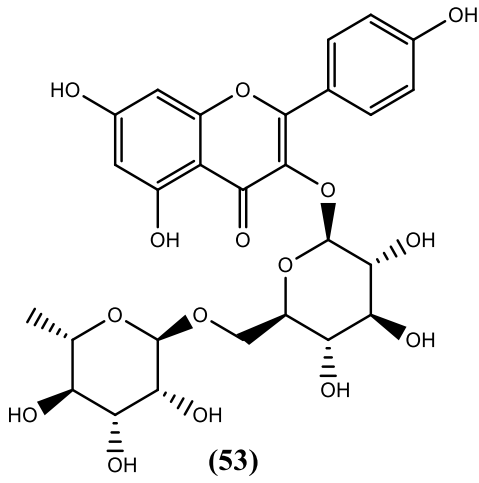
### 3.11 Gênero *Ouratea*

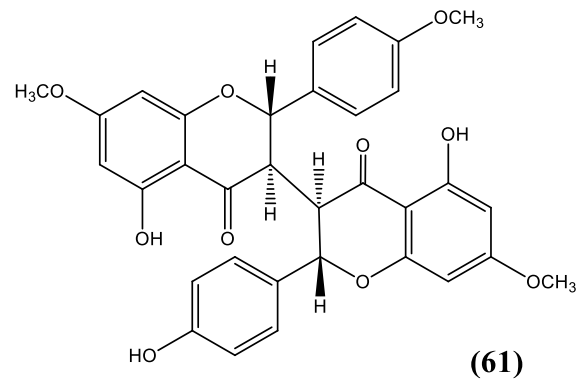
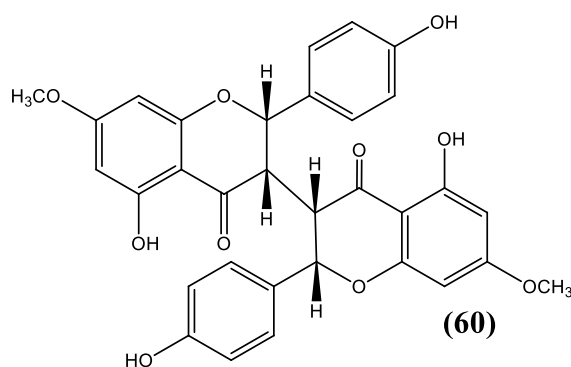
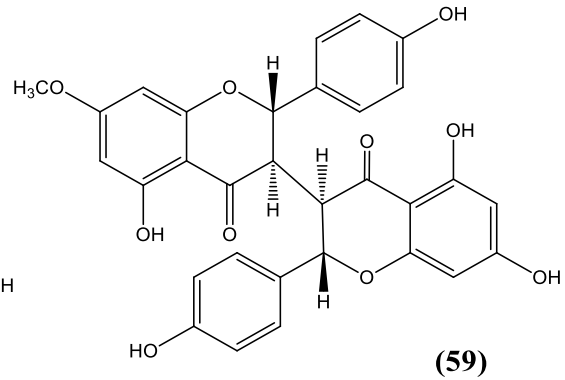
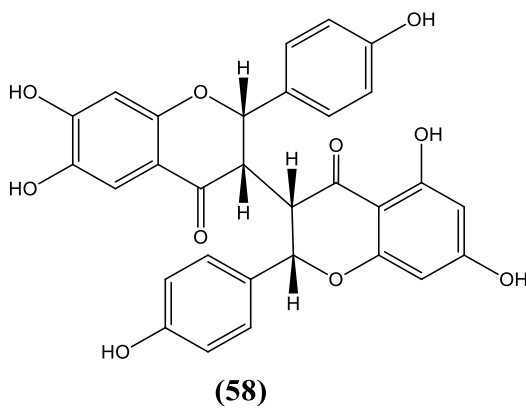
A família Ochnaceae possui 27 gêneros e 600 espécies tropicais distribuídas em zonas tropicais e subtropicais, ocorrendo predominantemente em países da América do Sul e África tropical, sendo o gênero *Ouratea* o maior da família (FIDELIS et al., 2014). Quimicamente, essa família tem se destacado como uma fonte relevante de biflavonoides e outros compostos fenólicos, os quais apresentam particular expressão em *Ouratea*. No gênero *Ouratea*, tais metabólitos apresentam-se majoritariamente como dímeros de flavonas e chalconas, sendo as biisoflavonas encontradas com menor frequência (FIDELIS et al., 2014). Esse padrão

fitoquímico tem sido proposto como um importante marcador quimiotaxonômico para o gênero, sustentando a relevância dos biflavonoides na delimitação e compreensão evolutiva do grupo.

No contexto específico da química de *Ouratea*, estudos mostram que dois biflavonoides foram isolados do extrato metanólico de folhas de *O. hexasperma* e *O. semiserrata*: 7"-*O*-metil-agatisflavona (**51**) e amentoflavona (**52**) (GRYNBERG et al., 2002). Já do extrato etanólico da semente dos frutos da *O. fieldingiana* foi isolado o canferol 3-*O*-rutinosídeo (**53**) (NASCIMENTO et al., 2018). A partir do extrato etanólico de folhas de *O. semiserrata* foram isolados 6-*O*-(4-hidroxibenzoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo de 4-hidroxifenila (**54**, lanceolosídeo A), rutina (**55**), epicatequina (**56**), amentoflavona (**52**) e agatisflavona (**57**) (CAMPANA et al., 2015). O estudo fitoquímico do extrato etanólico de cascas de *O. spectabilis* levou ao isolamento das biflavanonas ourateínas A, B, C, D (**58**, **59**, **60** e **61**) (ROCHA et al., 2020).







### 3.12 Espécies de *Ouratea* com atividade antiviral

A busca por novos agentes antivirais de origem natural tem direcionado a investigação científica para espécies do gênero *Ouratea*. Em estudo *in vitro*, a ourateína D (Our-D), uma biflavanona isolada de *O. spectabilis*, demonstrou expressiva atividade anti-betacoronavírus, reduzindo a replicação do MHV-3 em até 1,5 log a 10  $\mu\text{M}$  e promovendo completa eliminação viral a 30  $\mu\text{M}$ , além de exercer efeito citoprotetor nas células infectadas (MONTEIRO et al., 2025). A análise concentração–resposta indicou valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $6,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$  e  $\text{CC}_{50}$  de  $16,01 \pm 2,0 \mu\text{M}$  ( $\text{IS} = 2,5$ ). Em modelos murinos de infecção por betacoronavírus, o tratamento com Our-D, por via oral ou intraperitoneal, reduziu significativamente a carga viral em pulmões, coração e baço, atenuou a infiltração leucocitária e o dano pulmonar, diminuiu a expressão de mediadores inflamatórios (como CCL2, IL-6 e CXCL1) e aumentou os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10. Além disso, a administração de Our-D resgatou 25% (via oral) e 50% (via intraperitoneal) dos animais da letalidade induzida pelo MHV-3, indicando efeito antiviral sistêmico aliado a ações imunomoduladoras que, em conjunto, sustentam seu potencial terapêutico contra betacoronavírus (MONTEIRO et al., 2025).

Ainda em ensaios *in vitro* as ourateínas também demonstraram atuar diretamente sobre alvos virais essenciais como a protease principal do SARS-CoV-2. A Our-C e Our-A exibiram as maiores inibições da atividade enzimática após pré-incubação com a Mpro recombinante, alcançando  $85\% \pm 1\%$  e  $60\% \pm 4\%$  de inibição, respectivamente. A determinação posterior dos valores de  $CI_{50}$  reforçou o potencial inibitório das ourateínas, revelando maior potência para Our-A ( $CI_{50} = 9 \pm 2 \mu\text{M}$ ) e efeito moderado para Our-C ( $CI_{50} = 58 \pm 4 \mu\text{M}$ ). Esses resultados mostram que biflavanonas do gênero *Ouratea* podem interferir diretamente no processamento das proteínas virais, atuando sobre a Mpro, enzima imprescindível para a replicação do SARS-CoV-2, de forma análoga ao observado para outros metabólitos fenólicos com atividade antiviral já descrita na literatura (MONTEIRO et al., 2025).

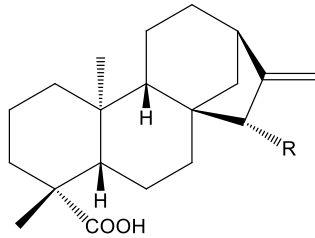
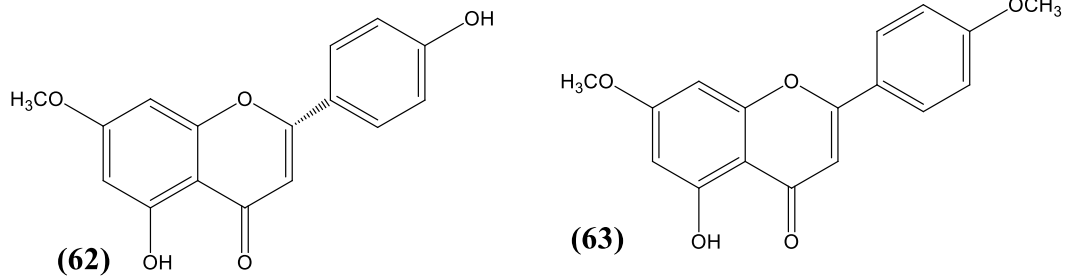
Nesse mesmo estudo, nos ensaios *in silico*, as Our-A e Our-C exibiram afinidade relevante pela Mpro do SARS-CoV-2, apresentando os modos de ligação mais estáveis e semelhantes ao da miricetina, posicionando seus anéis nos bolsos S1, S2 e S3 e estabelecendo interações essenciais com Thr26, Tyr54 e, sobretudo, com Glu166. A metilação presente em Our-B e Our-D reduziu a formação de ligações de hidrogênio, resultando em poses menos estáveis e expulsão parcial do sítio durante as simulações de dinâmica molecular (MONTEIRO et al., 2025).

### 3.13 Gênero *Baccharis*

A família Asteraceae engloba 1.100 gêneros e 25.000 espécies. *Baccharis* é um gênero pertencente a essa família e apresenta cerca de 500 espécies que são encontradas nas Américas do Norte e Sul (ROMERO-BENAVIDES et al., 2018). No Brasil, 179 espécies foram identificadas (SOUZA et al., 2021). Estima-se que 20% das espécies de *Baccharis* já identificadas sejam utilizadas para fins medicinais (ROMERO-BENAVIDES et al., 2018).

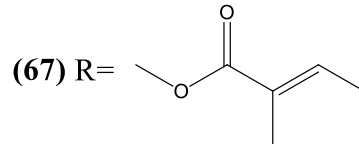
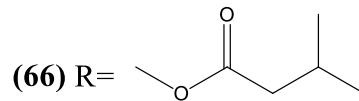
Estudos químicos realizados em espécies do gênero identificaram a presença de diferentes substâncias. Do extrato etanólico de folhas da *B. obtusifolia* foram isolados dois flavonoides: sakuranetina (5,4'-diidroxí-7-metoxiflavanona) (**62**) e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**63**) (ROMERO-BENAVIDES et al., 2018). A partir do extrato hexânico de partes aéreas de *B. retusa* e *B. lateralis* foram isolados quatro diterpenos: ácido ent-kaur-16-en-19-óico (**64**), ácido 15 $\beta$ -hidroxí-ent-kaur-16-en-19-óico (ácido grandiflórico) (**65**), ácido 15 $\beta$ -

senecioiloxi-ent-kaur-16-en-19-óico (**66**), e ácido 15 $\beta$ -tiglinoiloxi-ent-kaur-16-en-19-óico (**67**) (SILVA et al., 2022).

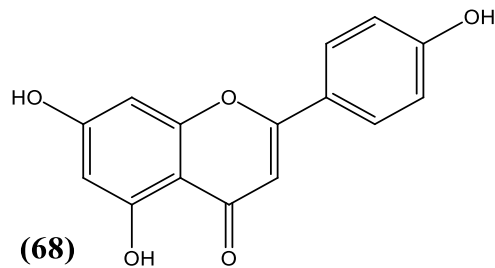


(64) R= H

(65) R= OH



O flavonoide apigenina (**68**) foi isolado do extrato diclorometano/metanol (1:1) de partes aéreas de *B. gaudichaudiana*, identificado como um potente inibidor da replicação viral do poliovírus tipo 2 (PV-2) em células Vero (JAIME et al., 2013).



### 3.14 Atividade antiviral do gênero *Baccharis*

A atividade antiviral de espécies do gênero *Baccharis* é comumente relatada na literatura. Ensaio *in vitro* realizados com extrato e frações da espécie *B. anômala* demonstraram marcante efeito virucida quando incubados diretamente com as partículas virais antes da adsorção, promovendo significativa perda de infectividade frente ao vírus HSV-1 (VENTURI et al., 2017).

Em ensaios *in vitro* as espécies *B. gaudichaudiana* e *B. spicata* demonstraram atividade antiviral relevante frente aos poliovírus tipo 2 (PV-2) e ao vírus da estomatite vesicular (VSV) nos ensaios de redução de efeito citopático viral. Os óleos essenciais de ambas apresentaram atividade antiviral contra esses dois vírus, enquanto o extrato aquoso de *B. gaudichaudiana* também exibiu forte ação contra HSV-1 na concentração de 35 µg/mL, alcançando elevados índices de seletividade (>117). Consequentemente, o flavonoide apigenina 5, 7-diidroxí-2-(4-hidroxilfenil)-4H -chromen-4-ona (**68**) isolada da *B. gaudichaudiana* apresentou atividade frente aos vírus da hepatite C, HSV e vírus da imunodeficiência humana, demonstrando também atividade frente a cepa do vírus H5N1 da influenza aviária (JAIME et al., 2013).

Ainda no estudo de Jaime et al. (2013) a espécie *B. gaudichaudiana* também foi avaliada em ensaios *in vitro* frente aos vírus HSV-1 e PV-2 demonstrando atividade antiviral relevante nos ensaios iniciais, com inibição e boa seletividade dos extratos orgânicos e aquosos. O extrato etanólico da *B. gaudichaudiana* apresentou atividade antiviral frente ao vírus HSV-1, com IS > 117, enquanto na triagem contra PV-2, o extrato etanólico apresentou IS = 10,9, configurando-se como um dos mais seletivos para esse vírus entre os extratos avaliados (JAIME et al., 2013). Além disso, nesse estudo, foi isolada a apigenina, que exibiu IS = 18,9 contra PV-2, reforçando o papel dos flavonoides como metabólitos antivirais chave em *Baccharis*.

Nesse contexto, o estudo de Lingua et al. (2024) o extrato em clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) de *Baccharis crispa* apresentou índice de seletividade (IS) = 2,3 frente ao CHIKV, indicando atividade antiviral moderada. Além disso, esse mesmo extrato também se destacou pela atividade observada contra o HSV-1, com IS = 3,4.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Solventes e reagentes

- Acetato de etila P.A., Dinâmica;
- Azul de tripam, Dinâmica;
- Cristal violeta P.A, Dinâmica;
- Dimetilsulfóxido P.A, Dinâmica;
- Etanol P.A, Lichrosolv;
- Formaldeído 40%, Carlo Erba;
- Meio de cultura D-MEM estéril, Cultilab;
- Metanol P.A, Neon;
- Brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT) – ThermoFisher;
- *n*-Hexano P.A., Neon;
- Nitrogênio líquido (Nitro express);
- Soro fetal bovino estéril, Gibco;
- Tampão fosfato salino, Sigma Aldrich;
- Tripsina-EDTA estéril, Gibco.

### 4.2 Materiais diversos

- Câmara de Neubauer, Labor Optik;
- Garrafas pequenas (25 cm<sup>2</sup>, volume 30mL), médias (75 cm<sup>2</sup>, volume 200mL);
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, Kasvi;
- Papel alumínio;
- Pipeta automática 200 µL, Brand;
- Pipeta multicanal automática 300 µL, Brand;
- Pipeta multicanal automática 100 µL, Brand;
- Pipeta manual 100 µL, Brand;
- Pipeta manual 1000 µL, Labmate;
- Ponteiras plásticas 100 e 200 µL, Corning;
- Ponteiras plásticas 1000 µL, Sarstedt;
- Placas de 24 poços para cultivo celular, Kasvi;
- Racks;

- Tubos de centrifugação de fundo cônico 15 mL, Kasvi;
- Tubos de centrifugação 50 mL, Kasvi;
- Pipeta sorológica descartáveis, estéreis, de 2, 5, 10 e 25 mL, Kasvi;
- Microtubos de centrifugação 1,5 mL, Olen;
- Filtro de membrana 0,22 µm, estéril, Kasvi;
- Filtro de membrana 0,22 µm, estéril, Corning;
- Microtubos de centrifugação 2,0 mL, Kasvi;
- Placas de alumínio DC - Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/UV 254.

### 4.3 Equipamentos

- Autoclave Vertical AV – Phoenix Luverco;
- Balança analítica, Denver instrument, modelo PI – 225;
- Balança analítica – Mettler Toledo;
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000;
- Banho-maria, modelo ALB 250C – INBRAS;
- Coletor de fração, FC 203B, Gilson;
- Estufa de cultura 502 – Orion;
- Estufa de CO<sub>2</sub> Thermo Scientific, series II Water Jacket;
- Evaporador rotatório Buchi, modelo B-480.
- Fluxo laminar, modelo Bio Seg 12;
- Freezer -80 °C, Termo Scientific, series 88000;
- Lavadora ultra-sônica – Ultrasonic Cleaner, Uniquer;
- Leitor de microplacas Varioskan LUX – Thermoscientific;
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101;
- Microscópio óptico – Olympus CKX41;
- Purificador de água Milli-Q Plus – Direct-Q 3 Millipore;
- Phmetro 827 PH lab – metrohm pensalab;
- Refrigerador;
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) Waters, modelo Acquity M Class, equipado com injetor automático, detector de arranjo de diodos (PAD) 2996,

espectrômetro de massas triplo quadrupolo Waters, modelo TQD, equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) e software MassLynx para processamento de dados.

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Waters® 2695, constituído por injetor automático, detector de arranjos de diodos PDA 2996, bomba quaternária L 6200a com degaseificador de linhas, e sistema computadorizado operado pelo programa Empower, Waters®;
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) em escala preparativa Waters, equipado com sistema de bomba binária 1525, injetor automático 2707, detector no ultravioleta (UV) 2489, coletor automático de frações WFC III e software Empower para processamento dos dados;
- Vortex – Global Thade Technology.

#### **4.4 Eluentes para CCD**

Os eluentes foram preparados utilizando os solventes *n*-hexano P.A, e acetato de etila P.A em proporções variadas (90:10 hexano/EtOAc, 70:30 hexano/EtOAc, 50:50 hexano/EtOAc, 10:90 hexano/EtOAc, 30:70 hexano/EtOAc). A solução foi homogeneizada e transferida para uma cuba cromatográfica de vidro para CCD.

#### **4.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

As cromatoplasmas foram preparadas sobre placa de vidro utilizando suspensão de sílica gel Merck G60 com indicador de fluorescência em água [7 g para 15 mL (m/v)], camada de 0,25 mm de espessura. As placas de CCD foram ativadas à 100 °C por 2 h.

#### **4.6 Revelador para CCD**

Reagente anisaldeído - ácido sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996). Seguindo essa sequência, foram misturados lentamente e empregando banho de gelo 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado.

#### 4.7 Extratos para estudo

Extratos de espécies vegetais disponíveis na extratoteca do Laboratório de Fitoquímica foram selecionados para estudo após extensa revisão da literatura, sendo priorizados aqueles com atividade anti-inflamatória e/ou antiviral já relatada para a espécie ou para o gênero, bem como pela presença de polifenóis complexos e/ou com padrão de oxigenação pouco usual. O levantamento da composição química das espécies foi realizado através da busca em bancos de dados (Pubmed, Scopus, SciFinder, Web of Science e outros). Dessa forma, foram identificadas candidatas para estudo com potencial antiviral e anti-inflamatório, todos listados na **Tabela 2**.

Com relação às espécies pertencentes às famílias Celastraceae, e Alismataceae apresentadas na **Tabela 2**, é importante destacar que a seleção seguiu os mesmos critérios gerais adotados para as demais plantas investigadas no presente estudo. Embora essas famílias não tenham sido detalhadas previamente na revisão da literatura, sua inclusão baseou-se na combinação dos seguintes fatores: (1) disponibilidade dos extratos na extratoteca institucional; (2) existência de relatos fitoquímicos demonstrando a presença de compostos fenólicos, flavonoides ou triterpenos com potencial farmacológico; e (3) dados preliminares das atividades antiviral (HUANG et al., 2021; NUNES et al., 2023;) anti-inflamatórias (ZHANG et al., 2017; LIU et al., 2019) descritas na literatura para espécies dos gêneros. Por outro lado, não foram encontrados estudos específicos sobre atividade antiviral contra coronavírus, o que reforça a pertinência da triagem inicial realizada neste trabalho. Dessa forma, a inclusão dessas duas famílias representa uma estratégia exploratória fundamentada na diversidade química conhecida e na oportunidade de investigar grupos taxonômicos ainda pouco estudados quanto ao potencial antiviral.

**Tabela 2:** Espécies vegetais selecionadas para estudo.

<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nº de Exsicata</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Solvente extrator</b>
<b>Asteraceae</b>	<i>Baccharis myriocephala</i> DC.	ECT6257	Folha	Etanol
	<i>Baccharis oreophila</i> Malme.	ECT5919	Caule	Etanol
	<i>Baccharis stylosa</i> Gardner.	ECT5950	Caule	Etanol
	<i>Baccharis itatiaiae</i> Wawa	ECT931	Caule	Etanol
	<i>Baccharis máxima</i> Backer	ECT5937	Caule	Etanol
	<i>Baccharis montana</i> DC.	ECT5928	Caule	Etanol
	<i>Baccharis grandmucromata</i> Malag	ECT5934	Caule	Etanol
	<i>Baccharis regnellii</i> Sch.Bip.	ECT5944	Caule	Etanol
<b>Ochnaceae</b>	<i>Ouratea semiserrata</i> (Mart. & Nees) Engl.	BHCB49269	Folha	Etanol
	<i>Ouratea spectabilis</i> Mart. ex Engl.	BHCB48940	Folha	Etanol
	<i>Ouratea casteneifolia</i>	BHCB50394	Folha	Etanol
<b>Combretaceae</b>	<i>Terminalia phaeocarpa</i> Eichler	BHCB201083	Folha	Etanol
<b>Celastraceae</b>	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	FUEL21881	Folha	DCM
<b>Alismataceae</b>	<i>Equinodorus grandiflorus</i>	BHCB107791	Folha	Etanol

BHCB = Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais; BHZB = Herbário da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte; ECT = Herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Clima Temperado, Rio Grande do Sul; FUEL = Herbário da Universidade Federal de Londrina, Brasil; DCM = diclorometano.

#### 4.8 Material Vegetal

As folhas de *T. phaeocarpa* utilizadas no estudo fitoquímico foram anteriormente coletadas por Gomes et al. (2021), na estação ecológica da UFMG (19° 52' 37.987" S; 763° 58' 22.668" O e 19° 52' 37.828" S 763° 58' 27.363" O). A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. João Renato Stehmann, do Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. O material vegetal coletado foi lavado e seco em estufa com circulação forçada de ar à 50 °C por 72 h e, então, pulverizado em moinho de facas.

Os caules de *B. grandmucromata* foram anteriormente coletados no Parque Nacional do Itatiaia, no Estado do Rio de Janeiro, pelo professor Dr. Geraldo Wilson Fernandes, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais e identificado pelo pesquisador Dr. Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado (ECT), Pelotas. O material vegetal coletado foi lavado e seco em estufa com circulação forçada de ar à 50 °C por 72 h e, então, pulverizado em moinho de facas.

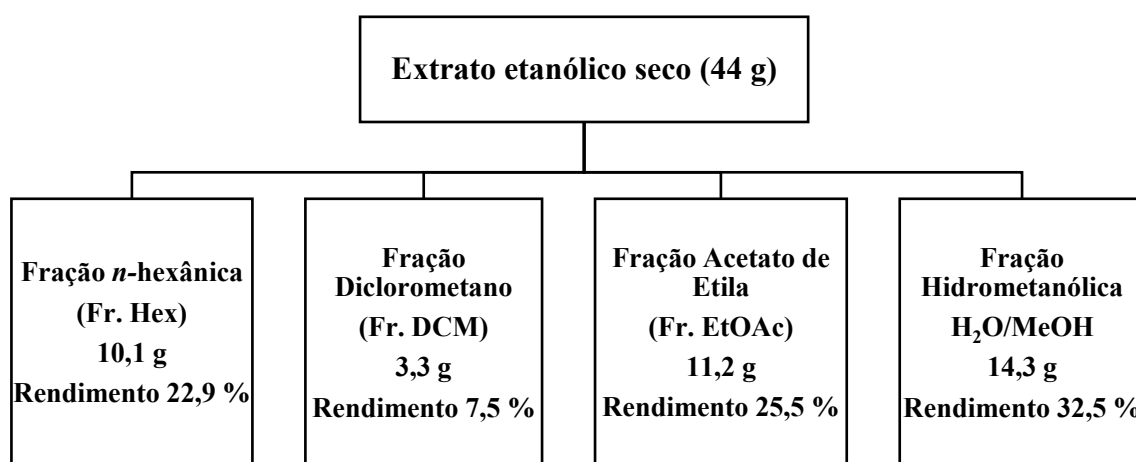
#### 4.9 Preparo dos extratos vegetais

O extrato etanólico de *T. phaeocarpa* foi anteriormente preparado por Gomes et al. (2021). Uma porção de 300 g do vegetal seco foi submetida à percolação exaustiva com etanol 96 °GL. O extrato etanólico obtido foi concentrado em rota evaporador a 55 °C e mantido em dessecador sob pressão reduzida para eliminação de solvente residual, resultando em 92,53 g do extrato seco (rendimento de 30,8%).

O material vegetal seco de espécie *B. grandmucromata* foi submetido à percolação exaustiva com etanol 96 °GL. Foram utilizados 295 g do material vegetal para percolação. O percolado foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida a temperatura média de 50 °C. O extrato foi transferido para frasco previamente tarado e em seguida liofilizado por 48 h para eliminação do solvente residual, obtendo massa de 12,21 g com rendimento de 4,1%.

#### 4.10 Fracionamento preliminar do extrato de *T. phaeocarpa*

O extrato etanólico de *T. phaeocarpa* foi fracionado por partição líquido-líquido entre solventes imiscíveis. Para tanto, solubilizou-se uma porção de 2,0 g do extrato etanólico em 50 mL de solução MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v), com auxílio de banho de ultrassom por 10 min. Em seguida, transferiu-se o extrato solubilizado para um funil de separação (500 mL) e particionou-se a solução hidrometanólica sequencialmente com *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM) e acetato de etila (EtOAc) (3 × 50 mL cada). O processo foi repetido 22 vezes, utilizando uma massa total de 44 g do extrato etanólico, originando as frações Fr. Hex, Fr.DCM e Fr. EtOAc, bem como a fração hidrometanólica (Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O) residual (**Figura 11**).



**Figura 11:** Fracionamento do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* por partição entre solventes imiscíveis e massas das frações obtidas.

#### 4.11 Ensaios biológicos *in vitro*

A atividade antiviral dos extratos foi inicialmente avaliada em concentrações não citotóxicas frente ao coronavírus murino MHV-3, em culturas de células L929. Os ensaios foram realizados conforme descrito por Caly e colaboradores (2020), com as modificações necessárias. Os extratos ativos no coronavírus MHV-3 foram então avaliados em célula Calu-3, infectadas com o vírus SARS-CoV-2, em laboratório de biossegurança 3 (NB3).

#### 4.12 Linhagem de células e vírus

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, com nível de biossegurança 2 (NB-2), na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram utilizadas células L929 clone NCTC L929 de fibroblastos de camundongo (*Cercopithecus aethiops da American Type Culture Collection* - ATCC (CCL-1) e células epiteliais Calu-3, originária de pulmão humano (ATCC, HTB-55).

Utilizou-se um isolado clínico de coronavírus MHV-3 nos ensaios (GenBank n°. MW620427.1) gentilmente cedido por Clarice Weis Arns e Ricardo Durães-Carvalho da Universidade Estadual de Campinas –UNICAMP.

#### 4.13 Cultivo celular

As células L929 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 7% de soro fetal bovino (FBS), mantidas em estufa à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Os repiques foram realizados utilizando 5 mL de Tampão Fosfato Salino (PBS); posteriormente, foi adicionado 2,5 mL de tripsina EDTA, e incubadas em estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 2 a 4 minutos para o desprendimento de células aderidas.

Para estoque da linhagem celular, as células L929 foram suspensas utilizando 2,5 mL ( $1 \times 10^6$  células/mL) em meio de cultura DMEM contendo 25% (v/v) de FBS e 10% (v/v) DMSO. A suspensão celular foi inicialmente congelada em freezer à -80 °C por 48 horas, e posteriormente transferida para armazenamento em nitrogênio líquido a -196 °C.

Para realização dos ensaios de citotoxicidade, atividade antiviral e titulação viral, as células L929 foram descongeladas e transferidas para garrafas estéreis (25 cm<sup>2</sup>) com meio de cultura DMEM contendo 20% de FBS. Aguardou-se 24 horas para aderência das células e substituiu-se o meio de cultura para retirada de DMSO, tripsina e células mortas presentes no congelamento. O crescimento e adesão das células foram observadas diariamente em microscópio óptico para obtenção de boa confluência (80%) e transferência da cultura para garrafa com área de 75 cm<sup>2</sup>.

De forma semelhante, as células Calu-3 foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10% de soro fetal bovino (FBS), mantidas em estufa à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realização dos ensaios de citotoxicidade, atividade antiviral e titulação viral, as células Calu-3 foram descongeladas e transferidas para garrafas estéreis (25 cm<sup>2</sup>) com meio de cultura DMEM contendo 20% de FBS. Aguardou-se 24 horas para aderência das células e substituiu-se o meio de cultura para retirada de DMSO, tripsina e células mortas presentes no congelamento. O crescimento e adesão das células foram observadas cotidianamente em microscópio óptico para obtenção de boa confluência (80%) e transferência da cultura para garrafa com área de 75 cm<sup>2</sup>.

#### **4.14 Preparo dos extratos para ensaio de citotoxicidade**

Foram pesados, exatamente, 2 mg dos extratos das espécies selecionadas em frascos do tipo *safe lock* com 2 mL de capacidade. A eles foram adicionados 100 µL de DMSO e 400 µL de etanol, procedendo-se a completa solubilização em banho de ultrassom por 10 min. A solução dos extratos obtida na concentração de 4 mg/mL, constituiu a solução estoque, a qual foi armazenada em freezer a -20 °C. Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, a solução estoque foi descongelada no dia do experimento e diluída com meio de cultura DMEM. Para se obter a concentração de 1 mg/mL foram adicionados 250 µL da solução estoque em 750 µL de meio cultura DMEM a 2% de FBS. Para se obter as concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL foram adicionados, respectivamente, 990, 970 e 910 µL de DMEM a 2% de FBS à 10, 30 e 90 µL do extrato diluído (1 mg/mL). As soluções obtidas foram homogeneizadas em vórtex por aproximadamente 1 minuto.

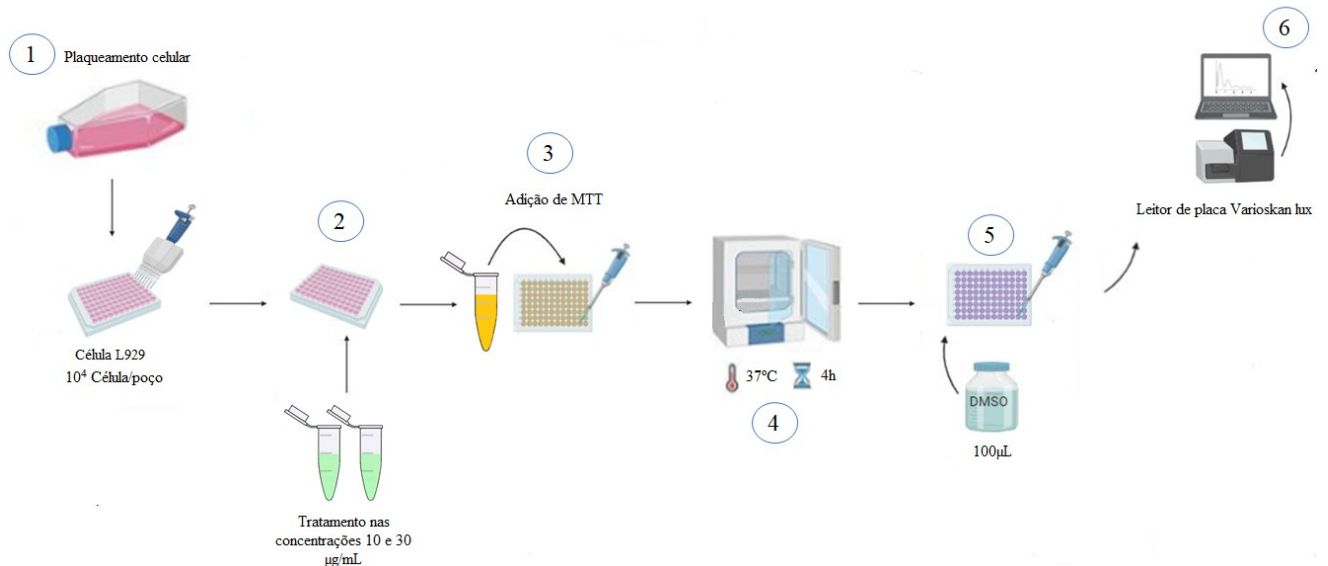
#### **4.15 Avaliação da citotoxicidade dos extratos**

A viabilidade das células L929 (**Figura 12**) foi avaliada frente à adição dos extratos nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL, pelo ensaio colorimétrico de brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio - MTT, utilizando o DMSO como controle negativo conforme descrito por Mosmann (1983).

Os ensaios foram realizados utilizando células L929 oriundas de três descongelamentos diferentes (triplicatas biológicas), e executados em triplicata (triplicatas experimentais). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço, determinada pela equação (1) e incubadas em estufa à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

$$N = x/4 * 10^4 * 10 * 2$$

**Equação 1:** Equação utilizada para plaqueamento: onde N é o número de células adicionado ao poço e x o número de células viáveis obtida na contagem na câmara de Neubauer.



**Figura 12:** Etapas do ensaio de citotoxicidade das espécies selecionadas, segundo Mosmann (1983).

Os ensaios foram realizados utilizando os seguintes poços: células com meio de cultura (B, branco), células com meio de cultura acrescido de 0,05% (10  $\mu\text{g/mL}$ ), 0,15% (30  $\mu\text{g/mL}$ ) e 0,45% (90  $\mu\text{g/mL}$ ) de DMSO e 0,2% (10  $\mu\text{g/mL}$ ), 0,6% (30  $\mu\text{g/mL}$ ) e 1,8% (90  $\mu\text{g/mL}$ ) de etanol) (V, veículo), e células com meio de cultura e extratos nas concentrações de 10, 30 e 90  $\mu\text{g/mL}$ , de acordo com o esquema de placa representado na **Figura 13**.

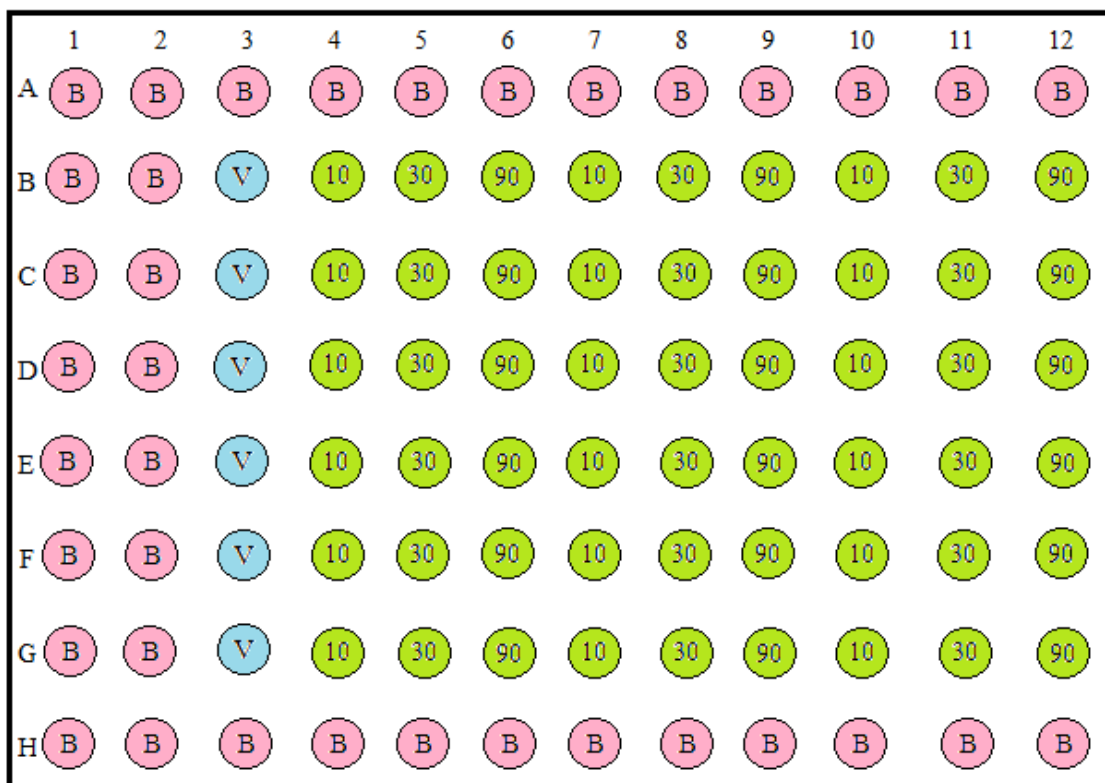
Após 24 horas de incubação, o meio foi removido e a placa foi lavada duas vezes com 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras (10, 30 e 90  $\mu\text{g/mL}$ ) a cada poço (**Figura 13**). Em seguida, as placas foram incubadas à  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , por 24 horas. Findo este tempo, o sobrenadante foi removido e as placas foram novamente lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Na sequência, foram adicionados, a cada poço, 100  $\mu\text{L}$  de solução a 0,5  $\text{mg/mL}$  de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) preparada em meio de cultura DMEM sem FBS. As placas foram revestidas com papel alumínio, levadas para estufa e incubadas à  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ , por 4 horas.

Após este período, foi removido o sobrenadante e adicionados 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Foi realizada leitura da absorbância no comprimento de

onda de 570 nm em leitor de microplacas. Os valores de absorbância foram obtidos e a viabilidade celular foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{viabilidade celular} = [(A \times 100) / B]$$

Onde **A** é o valor de absorbância das células tratadas e **B** a absorbância das células não tratadas.



**Legenda:** B: branco; V: veículo; 10, 30 e 90 concentrações dos extratos.

**Figura 13:** Esquema de placa para ensaio de citotoxicidade.

Semelhantemente, os ensaios de citotoxicidade em células Calu-3 foram realizados conforme apresentado para os ensaios de citotoxicidade nas células L929. O ensaio foi realizado utilizando apenas um descongelamento e executados em triplicata (triplicatas experimentais). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço, determinada pela equação (1) e incubadas em estufa à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

#### **4.16 Determinação da Multiplicidade de Infecção – MOI**

Previamente aos ensaios de atividade antiviral realizou-se a padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do MHV-3. A padronização foi realizada utilizando as MOI 0,001; 0,01; 0,1 com os tempos de incubação de 4, 8, 16, 24 e 48 h, com base em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa. A padronização da MOI do MHV-3 foi realizada em células L929. O desenho experimental foi realizado com os seguintes poços testes: poços contendo células somente com meio e poços contendo células infectadas com MHV-3 em diferentes MOIs. A viabilidade celular das células L929 infectadas pelo MHV-3 em diferentes MOIs foi avaliada pelo método do MTT.

#### **4.17 Avaliação da atividade antiviral**

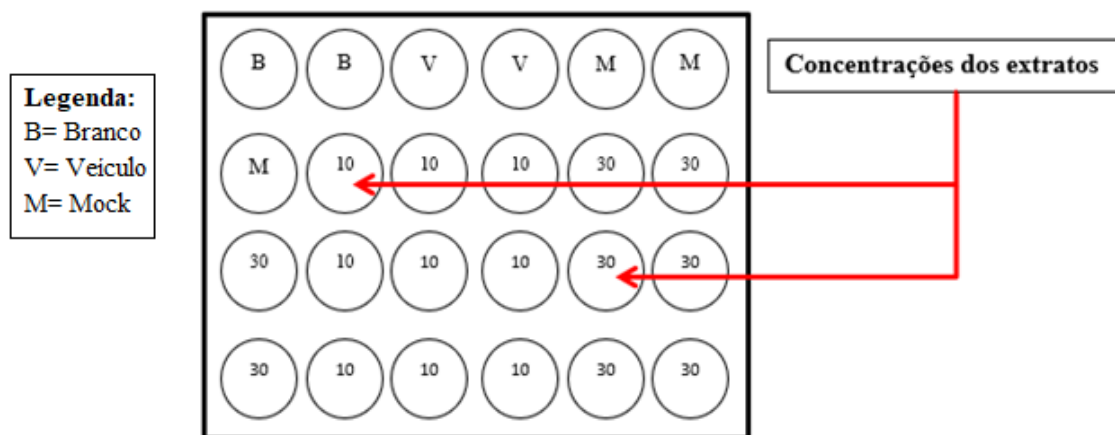
Os ensaios para avaliação de atividade anti-MHV-3 em células L929 foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas, empregando células e vírus oriundos do mesmo estoque, no entanto, obtidos de três descongelamentos distintos. Os extratos foram avaliados em concentrações consideradas não citotóxicas, isto é, que apresentaram viabilidade celular superior a 80 %, determinada pelo ensaio do MTT (item 4.15). As soluções estoques dos extratos foram descongeladas e diluídas para concentrações de 10 e 30 µg/mL com meio de cultura DMEM a 2% de FBS no dia da realização do ensaio. Como controle negativo foi utilizado o 0,225% DMSO e 0,9% etanol.

Os ensaios para avaliação de atividade anti-SARS-CoV-2 em células Calu-3 foram realizados pelo pesquisador Dr. Leonardo Camilo Oliveira em laboratório de Nível Biosegurança 3 – NB3 no Laboratório Nacional Agropecuária, localizado em Pedro Leopoldo/MG. Os ensaios foram realizados em duplicatas biológicas e triplicatas experimentais. Os extratos foram avaliados em concentrações não citotóxicas (item 4.15). As soluções estoques dos extratos foram descongeladas e diluídas para concentrações de 10 e 30 µg/mL com meio de cultura MEM a 2% de FBS no dia da realização do ensaio. Como controle negativo foi utilizado o EtOH e DMSO a 0,9 e 0,225 % v/v.

## 4.18 Ensaio de atividade antiviral

### 4.18.1 MHV-3

A disposição dos grupos na placa de 24 poços foi realizada de acordo com o esquema ilustrado na **Figura 14**. Foram utilizados poços contendo somente células L929 com meio de cultura DMEM a 2% de FBS (**Branco**); vírus MHV-3 (MOI 0,01), 0,225% DMSO e 0,9% etanol (diluinte dos extratos) (**Veículo**); poços contendo células, meio de cultura e o vírus MHV-3 (MOI 0,01 (**Mock**); e poços contendo células tratadas com as soluções dos extratos em meio de cultura DMEM e infectados com o MHV-3 na MOI de 0,01.



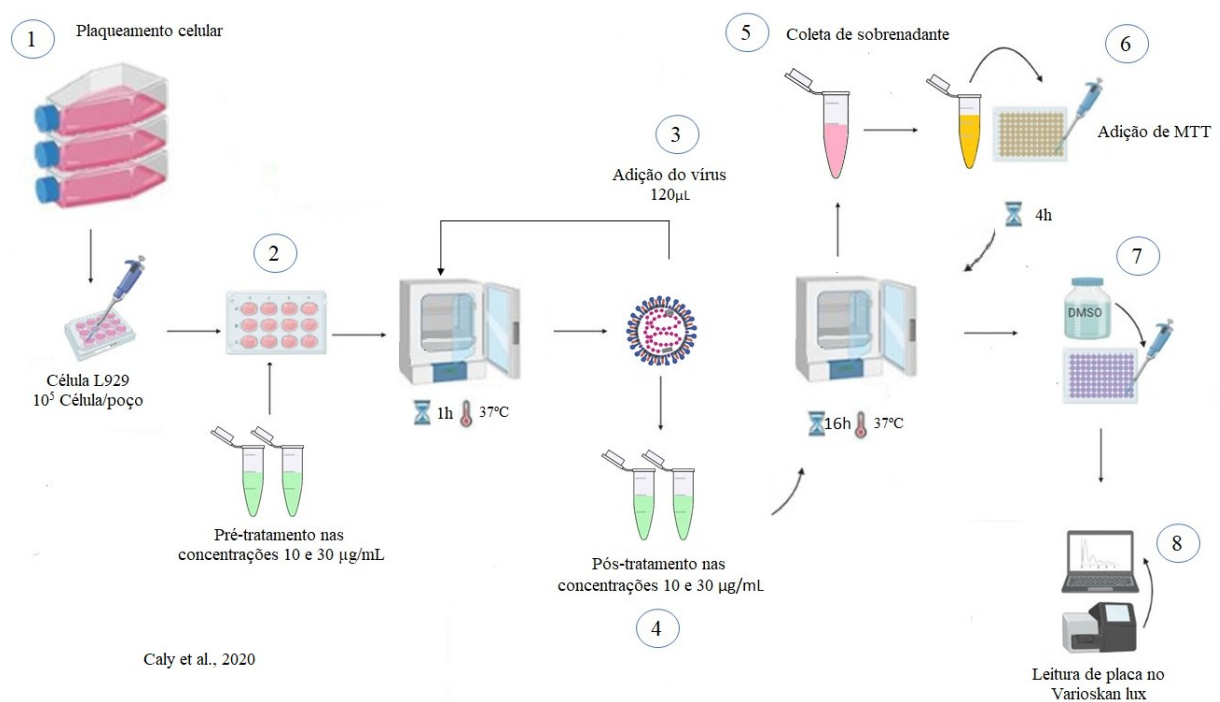
**Figura 14:** Esquema de placa para ensaio de atividade antiviral.

O ensaio seguiu o esquema descrito na **Figura 15**: plaqueamento, pré-tratamento, infecção, pós-tratamento e avaliação da viabilidade celular pelo método dos MTT. Assim, as células L929 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço, e incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Na sequência, descartou-se o meio e lavou-se a placa com 500 µL de PBS, descartando-o em seguida. Logo após, as células foram pré-tratadas, adicionou-se 300 µL de solução do extrato em cada poço, segundo o esquema de placa representado na **Figura 14**. Em seguida, a placa foi incubada por 1 hora em estufa à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Na sequência, o sobrenadante foi descartado e a placa novamente foi lavada com 500 µL de PBS, descartando-o em seguida.

Para a infecção foram adicionados 120 µL da suspensão do vírus MHV-3 (MOI 0,01). Em seguida, as placas foram incubadas à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora para a adsorção

viral, procedendo-se à agitação manual a cada 10 minutos. Após, o sobrenadante contendo o vírus MHV-3 foi removido e a placa foi lavada com 500  $\mu\text{L}$  de PBS, removendo-o em seguida. Imediatamente, após essa etapa de lavagem, foram adicionados em cada poço 300  $\mu\text{L}$  de solução dos extratos e a placa foi incubada à 37 °C com 5 % de  $\text{CO}_2$  por 16 horas caracterizando assim, um pós-tratamento após a infecção viral.

Findo este período, foram coletados 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, que foi imediatamente armazenado em ultrafreezer -80 °C para posteriormente realizar o teste de redução de placas de lise viral. Na sequência, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de solução de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço e a placa foi incubada à 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$  por 4 horas. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de DMSO para solubilização dos cristais de formazan, procedendo-se à leitura para avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 4.15.



**Figura 15:** Esquema do ensaio de atividade antiviral frente ao MHV-3.

#### 4.18.2 SARS-CoV-2

A disposição dos grupos na placa de 24 poços foi realizada seguindo o mesmo esquema ilustrado na **Figura 14**. Foram utilizados poços contendo somente células Calu-3 com meio de cultura MEM a 2% de FBS (**Branco**); vírus SARS-CoV-2 (MOI 0,1), 0,225% DMSO e 0,9% etanol (diluente dos extratos) (**Veículo**); poços contendo células, meio de cultura e o vírus

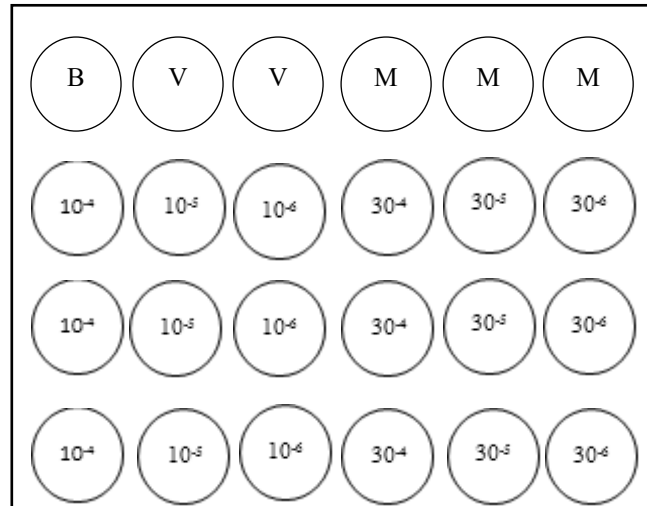
SARS-CoV-2 (MOI 0,1; **Mock**); e poços contendo células tratadas com as soluções dos extratos em meio de cultura MEM e infectados com o SARS-CoV-2 na MOI de 0,1.

As células Calu-3 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/poço, e incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Na sequência, as células foram pré-tratadas adicionando 300 µL de solução do extrato em cada poço, incubada por 1 hora em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Findo este tempo, as células foram infectadas com 120 µL da suspensão do vírus SARS-CoV-2 (MOI 0,1), incubadas à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora para a adsorção viral, procedendo-se à agitação manual a cada 10 minutos. Após, o sobrenadante contendo o vírus SARS-CoV-2 foi removido e a placa foi lavada com 500 µL de PBS, removendo-o em seguida. Imediatamente, para o pós-tratamento, foram adicionados em cada poço 300 µL de solução dos extratos e a placa foi incubada à 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 16 horas.

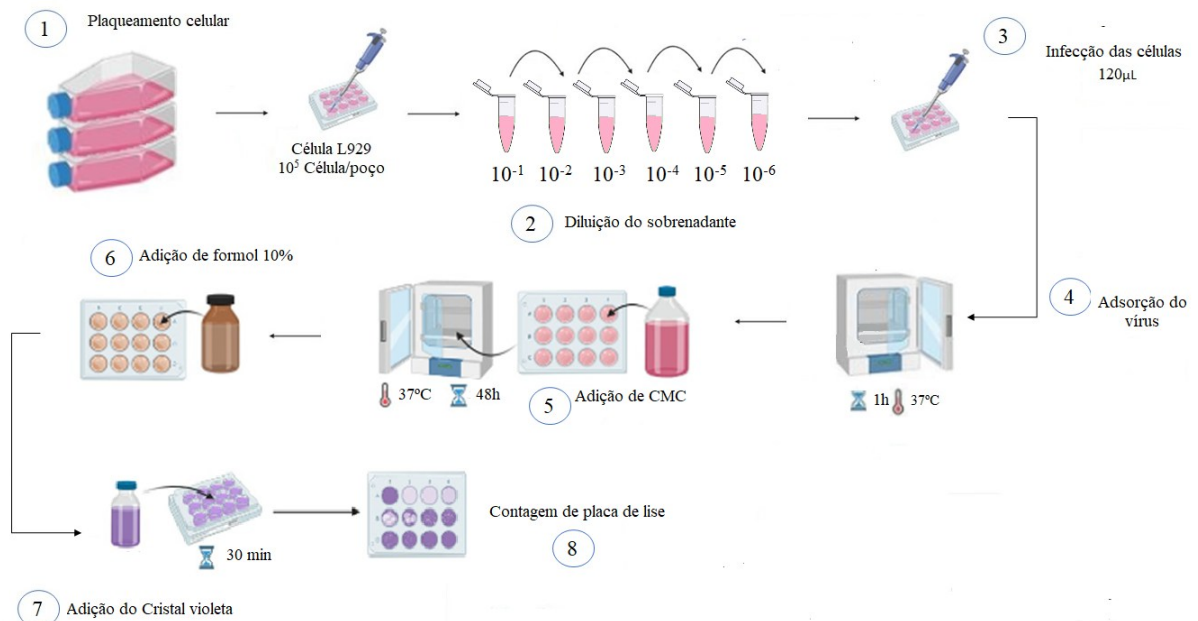
Findo este período, foram coletados 300 µL do sobrenadante, que foi imediatamente armazenado em freezer -80 °C para posteriormente realizar o teste de redução de placas de lise viral. Na sequência, foram adicionados 300 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) a cada poço e a placa foi incubada à 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan, procedendo-se à leitura para avaliação da viabilidade celular, conforme descrito no item 4.15.

#### 4.19 Titulação viral

Para o ensaio de titulação viral, primeiramente as células L929 foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço, e incubadas à 37 °C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes coletados no ensaio de atividade antiviral com MHV-3 (item 4.17) foram diluídos em  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em frascos do tipo *safe lock*, adicionando 50 µL do sobrenadante coletado em 450 µL de meio de cultura DMEM a 2% de FBS descrito no item 4.17. Logo após, o meio foi removido, e a placa foi lavada com 500 µL de PBS. Em seguida, foram adicionados 120 µL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  a cada poço, de acordo com o esquema apresentado na **Figura 16**. Posteriormente, as placas foram incubadas à 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por durante 1 hora e agitadas manualmente a cada 10 minutos. Após, foram adicionados a cada poço 500 µL de solução de carboximetilcelulose (CMC) a 2% (m/v) e novamente as placas foram incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas (**Figura 17**).



**Figura 16:** Esquema de placa para ensaio de titulação viral. **B**=Branco, **V**= veículo/controle, **M**= Mock, e os índices numéricos correspondem às diluições dos poços ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  e  $30^{-4}$  a  $30^{-6}$  algarismo sobrescrito) referentes ao tratamento com o extrato em diferentes concentrações (10 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Figura 17:** Esquema do ensaio de titulação viral.

Após 48 horas, foram adicionados a cada poço 1 mL de solução de formol tamponado a 10% e pH 7,4 para fixação; aguardou-se 2 horas e descartou-se o formol. As placas foram lavadas em água corrente e em seguida foi adicionado 1 mL da solução de cristal violeta 1% em cada poço. Aguardou-se 30 minutos, retirou-se a solução de cristal violeta e novamente as

placas foram lavadas em água corrente. Após a placa seca, foram contados os números de placas de lises de cada poço e os valores foram plotados utilizando o software Prisma 8.

Para a titulação viral de SARS-CoV-2, as células Calu-3, foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de  $1,5 \times 10^5$  células/poço, e incubadas à 37°C em atmosfera 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após esse tempo, os sobrenadantes coletados no ensaio de atividade antiviral (item 4.17) foram diluídos em 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup> em frascos do tipo *safe lock*, adicionando 50 µL do sobrenadante coletado em 450 µL de meio de cultura MEM a 2% de FBS descrito no item 4.17. Em seguida, foram adicionados 120 µL das diluições 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-6</sup> a cada poço, de acordo com o esquema apresentado na **Figura 16**. Posteriormente, as placas foram incubadas à 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por durante 1 hora e agitadas manualmente a cada 10 minutos. Após, foram adicionados a cada poço 500 µL de solução de carboximetilcelulose (CMC) a 2% (m/v) e novamente as placas foram incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 horas.

Após 48 horas, foram adicionados a cada poço 1 mL de solução de formol tamponado a 10% e pH 7,4; aguardou-se 2 horas e descartou-se o formol. As placas foram lavadas em água corrente e em seguida foram adicionados 1 mL da solução de cristal violeta 1% em cada poço. Aguardou 30 minutos, retirou-se a solução de cristal violeta e novamente as placas foram lavadas em água corrente. Após a placa seca, foram contados os números de placas de lises de cada poço e os valores foram plotados utilizando o software Prisma 8.

#### **4.20 Ensaio para determinação da CC<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e cálculo do IS**

As amostras com atividade antiviral frente ao MHV-3 foram ensaiadas para determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) e da concentração efetiva para promover redução de 50% na replicação viral (CE<sub>50</sub>).

Os experimentos foram realizados em duplicata biológica e triplicatas experimentais utilizando células L929 infectadas ou não com MHV-3. Para avaliação de citotoxicidade, as células não infectadas foram tratadas com soluções do extrato de *T. phaecarpa* ou das frações *n*-hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica nas concentrações de 810, 270, 90, 30, 10, 3,33, 1,11 e 0,37 µg/mL. A viabilidade celular foi avaliada empregando o ensaio colorimétrico do MTT conforme descrito anteriormente (item 4.15). Para determinação da

CE<sub>50</sub>, empregou-se as células L929 infectadas com MHV-3 e não tratadas (controle de vírus) ou tratadas com as amostras nas concentrações de 810, 270, 90, 30, 10, 1,11 e 0,37µg/mL. O ensaio foi realizado conforme previamente descrito nos itens 4.18.1 e 4.19.

Os valores de CC<sub>50</sub> e CE<sub>50</sub> foram calculados por meio de curvas concentração-resposta empregando análise de regressão não-linear, utilizando-se os valores de viabilidade celular ou PFU/mL para cada concentração. O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão entre CC<sub>50</sub> e a CE<sub>50</sub>, empregando a equação:

$$IS = CC_{50}/CE_{50}$$

#### 4.21 Análises estatísticas

A análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 8. (GraphPad Software, USA). Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral são apresentados como médias ± desvio padrão da média dos valores (%), comparados com o grupo veículo (MHV-3+ DMSO + EtOH) (\*p < 0,5, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,0001 - ANOVA com pós teste Dunnett). Para os resultados de titulação viral, os dados obtidos são expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL) e comparados com o grupo veículo (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*\*p < 0,0001), empregando ANOVA com pós teste de Tukey.

#### 4.22 Estudo fitoquímico dos extratos selecionados

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de atividade antiviral frente ao MHV-3, foram selecionados para estudo fitoquímico os extratos etanólico de *T. phaeocarpa* e *B. grandmucromata*, por apresentarem maior atividade inibitória anti-MHV-3.

##### 4.22.1 Análise dos extratos e frações obtidas por técnicas cromatográficas hífenadas

A caracterização fitoquímica das espécies foi realizada por técnicas cromatográficas hífenadas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de conjunto de Fotodiodos (HPLC-PDA) e Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Conjunto de Fotodiodos e Espectrômetro de Massas com Fonte de Ionização Electrospray e analisador tipo triplo quadrupolo (UPLC-PDA-ESI-MS/MS).

#### 4.22.2 Análises cromatográficas por HPLC-PDA

O perfil fitoquímico do extrato e das frações obtidos (item 4.22.1) foi avaliado a partir dos cromatogramas obtidos por HPLC-PDA, utilizando eluição em perfil exploratório. Assim sendo, empregou-se um sistema de HPLC Waters 2695, com coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × 4 mm d.i., 5 µm) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 × 4 mm d.i., 5 µm). A fase móvel compreendeu gradiente de eluição de água Milli-Q (A) e acetonitrila grau HPLC (B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, e a temperatura da coluna foi mantida em 40 °C (**Tabela 3**). O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min, a detecção foi realizada no comprimento de onda de 210 a 500 nm, utilizando-se o software Empower 2 para o processamento dos cromatogramas adquiridos. As amostras foram injetadas na concentração de 5 mg/mL, obtidas através da solubilização de 5 mg em 1,0 mL de MeOH HPLC/H<sub>2</sub>O Milliq (1:1, v/v) grau HPLC, realizada diretamente em tubos plásticos tipo *safe-lock*. A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por 15 min, centrifugada a 8.400 × g e 10 µL dos sobrenadantes foram injetados, automaticamente, no sistema de cromatografia descrito. Para equilíbrio inicial da fase móvel da coluna foi utilizado 30 minutos de condicionamento e 5 minutos entre cada injeção.

**Tabela 3:** Gradiente de eluição utilizado para obtenção do perfil fitoquímico do extrato etanólico de *T. phaeocarpa*.

Tempo (min)	%A	%B
0	95	5
65	5	95
70	5	95
75	95	5

\***Solvente A:** água acidificada com 0,1% de ácido fórmico; **Solvente B:** acetonitrila grau HPLC acidificada com 0,1% de ácido fórmico.

#### 4.22.3 Análises cromatográficas por UPLC-PDA-ESI-MS/MS

Os perfis fitoquímicos do extrato de *T. phaeocarpa* e das frações derivadas (Fr. Hex, Fr. DCM, Fr. EtOAc e Fr. MeOH/H<sub>2</sub>O) foram avaliados empregando o sistema de cromatografia a líquido de ultra eficiência (UPLC-PDA-ESI-MS/MS) da Waters Acquity UPLC system (Waters, USA), acoplado a detector de conjunto de fotodiodos (PDA: 190- 500 nm) em interface com espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo (MS-TQD) (Waters

Micromass). Para tanto, empregou-se uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC BEH C18, Waters;  $50 \times 2,1$  mm d.i.  $1,7 \mu\text{m}$ ) em combinação com uma pré-coluna (Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, Waters;  $2,1 \times 5$  mm d.i.  $1,7 \mu\text{m}$ ), utilizando-se eluição em gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com  $0,1 \%$  (v/v) de ácido fórmico. Empregou-se o gradiente de eluição descrito por Gomes e colaboradores (2021) (**Tabela 4**). Foram injetadas soluções das amostras na concentração de  $1 \text{ mg/mL}$ , obtidas através da solubilização de  $1 \text{ mg}$  em  $1,0 \text{ mL}$  de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) grau HPLC, realizada diretamente em tubos plásticos tipo *safe-lock*. A suspensão foi mantida em banho de ultrassom por  $15 \text{ min}$ , e centrifugada a  $8.400 \times g$  por  $10 \text{ min}$ , posteriormente, os sobrenadantes foram filtrados em membrana de PVDF ( $0,22 \mu\text{m}$ ), transferidos para *vials* e injetados no sistema de cromatografia. Um intervalo de  $4 \text{ minutos}$  foi adotado entre as análises para garantir o equilíbrio da coluna, com um tempo total de  $60 \text{ min}$  por análise. O fluxo utilizado foi de  $0,3 \text{ mL/min}$ , com volume de injeção de  $5,0 \mu\text{L}$ , mantendo-se a temperatura da coluna em  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabela 4:** Gradiente de eluição estabelecido para obtenção do perfil fitoquímico do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* e das frações derivadas (Fr Hex, Fr DCM, Fr EtOAc e MeOH/H<sub>2</sub>O).

Tempo (min)	%A*	%B*
0	95	5
12:00	90	10
20:00	80	20
25:00	75	25
28:00	70	30
32:00	65	35
45:00	60	40
50:00	5	95
55:00	5	95
56:00	95	5
60:00	95	5

\***Solvente A:** água acidificada com  $0,1\%$  de ácido fórmico; \***Solvente B:** acetonitrila grau HPLC acidificada com  $0,1\%$  de ácido fórmico.

Para as análises foi utilizado um espectrômetro de massas Xevo Triple Quadrupole MS (Waters) com fonte de ionização por electrospray (ESI), monitorando os modos negativo e positivo no modo *Scan*, operando em voltagem capilar de  $4,50 \text{ kV}$ ; temperatura da fonte de

120°C; temperatura de dessolvatação 400 °C; fluxo do gás do cone 60 L/h e fluxo do gás de dessolvatação em 600 L/h (**Quadro 1**). O intervalo de massas avaliado foi de  $m/z$  20 a 1974 Da.

**Quadro 1:** Condições espectroscópicas de detecção no modo ESI empregadas nas análises.

<b>Voltagens</b>	
<b>Capilaridade</b>	4.5 (kV)
<b>Cone</b>	20
<b>Extrator</b>	3.00
<b>Rf leans</b>	0.10
<b>Temperaturas</b>	
<b>Temperatura de dessolvatação</b>	400 °C
<b>Temperatura da fonte (°C)</b>	120 °C
<b>Fluxo de gases</b>	
<b>Gás de dessolvatação</b>	600 (L/h)
<b>Cone (L/h)</b>	60
<b>Analisador</b>	
<b>Resolução de massas baixas 1</b>	13.00
<b>Resolução de massas altas 1</b>	14.77
<b>Energia Iônica</b>	0.20
<b>Entrada</b>	50.00
<b>Saída</b>	50.00
<b>Energia de colisão</b>	3.00
<b>Resolução de faixas baixas 2</b>	10.39
<b>Resolução de faixas altas 2</b>	15.00
<b>Energia Iônica 2</b>	0.90
<b>Ganho</b>	1.00
<b>Espectroscopia na região do ultravioleta</b>	
<b>Faixa de varredura (nm)</b>	210-400nm
<b>Condições de injeções</b>	
<b>Volume de injeções</b>	5.00 µL
<b>Fluxo</b>	0,3 (mL/min)

#### 4.22.4 Refracionamento da Fr. Hex de *T. phaeocarpa*

A fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa*, que apresentou maior atividade antiviral (item 5.3), foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel a fim de isolar os constituintes bioativos. Utilizou-se coluna de vidro (119 cm de altura e 6 cm de diâmetro), à qual se adicionou suspensão de 700 g de sílica *flash* em *n*-hexano. Para o topo da coluna, primeiramente utilizando um almofariz, foi solubilizado 10 g da fração *n*-hexânica em 30 mL de hexano; em seguida foram adicionados, de forma gradativa, 10 g de sílica *flash* para incorporar à fração *n*-hexânica. Após remoção do solvente, a fração foi depositada no topo da coluna previamente empacotada com sílica gel *flash*. Procedeu-se à eluição em gradiente, iniciando com 100% de *n*-hexano e elevando gradualmente a força do eluente com proporções de acetato de etila, seguido de metanol. Foram coletadas frações com volume de 5 mL (**Tabela 5**).

**Tabela 5:** Gradiente de eluição em coluna de sílica gel empregada para o refracionamento da Fr. Hex de *T. phaeocarpa*.

Eluente	Proporção (%)	Volume (L)	Frações coletadas
Hex/EtOAc	98:2	1,4	1 – 160
Hex/EtOAc	96:4	1,4	161 – 321
Hex/EtOAc	94:6	1,4	322 – 483
Hex/EtOAc	92:8	1,4	484 – 564
Hex/EtOAc	90:10	1,4	565 - 726
Hex/EtOAc	85:15	1,4	727 – 889
Hex/EtOAc	80:20	1,4	890 – 970
Hex/EtOAc	75:25	1,4	971 – 1132
Hex/EtOAc	70:30	1,4	1133 – 1293
Hex/EtOAc	65:35	1,4	1294 – 1454
Hex/EtOAc	60:40	1,4	1455 – 1615
Hex/EtOAc	55:45	1,4	1616 – 1776
Hex/EtOAc	50:50	1,4	1777 – 1933
Hex/EtOAc	45:55	1,4	1934 - 2087
Hex/EtOAc	40:60	1,4	2088 - 2237
Hex/EtOAc	35:65	1,4	2238 - 2380
Hex/EtOAc	30:70	1,4	2381 - 2516

Hex/EtOAc	25:75	1,4	2517 - 2643
Hex/EtOAc	20:80	1,4	2644 - 2697
Hex/EtOAc	15:85	1,4	2698 - 2744
Hex/EtOAc	10:90	1,4	2745 - 2793
Hex/EtOAc	5:95	0,7	2794 - 2832
EtOAc	100	0,7	2833 - 2789
EtOAc/MeOH	95:5	0,7	2834 - 2869
EtOAc/MeOH	90:10	0,7	2870 - 2909
EtOAc/MeOH	80:20	0,7	2910 - 2949
EtOAc/MeOH	70:30	0,7	2950 - 2989
EtOAc/MeOH	60:40	0,7	2990 - 3030
EtOAc/MeOH	50:50	0,7	3031 - 3071
EtOAc/MeOH	30:70	0,7	3.072 - 3.112
MeOH	100	0,7	3.113 - 3153

As frações foram analisadas por CCD de sílica gel e agrupadas de acordo com a similaridade dos perfis, após revelação com anisaldeído sulfúrico (**Tabela 6**). Após as reuniões, as frações mais promissoras foram analisada por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas. O rendimento das frações obtidas pela cromatografia líquida em coluna foi de aproximadamente 75%.

**Tabela 6:** Agrupamento das frações resultantes do fracionamento do extrato etanólico de folhas de *T. phaeocarpa*.

Frações	Grupos	Massa do grupo (mg)	Frações	Grupos	Massa do grupo (mg)
1 a 5	GFJ5	7,1	986 a 1045	RFJ1045	19,0
6 a 9	GFJ9	15,4	1075 a 1105	RFJ1105	24,7
10	GFJ10	20,4	1120 a 1135	RFJ1135	56,1
11	GFJ11	28,7	1136 a 1139	RFJ1139	53,7
12	GFJ12	26,5	1140 a 1145	RFJ1145	32,1
13 a 29	GFJ39	40,6	1150 a 1180	RFJ1180	487,0
30	GFJ30	0,9	1185 a 1215	RFJ1215	363,9
31 a 55	GFJ55	14,5	1216 a 1219	RFJ1219	35,9
56 a 68	GFJ68	7,1	1220 a 1250	RFJ1250	137,3
70 a100	GFJ100	4,2	1255 a 1295	RFJ1295	77,1
100 a 140	GFJ140	2,4	1300 a 1310	RFJ1310	30,2

141 a 149	GFJ149	1,3	1311 a 1314	RFJ1314	47,5
150 a 185	GFJ185	0,5	1315 a 1320	RFJ1320	30,0
190 a 230	GFJ230	2,6	1325	RFJ1325	5,2
425 a 435	GFJ435	42,5	1330 a 1340	RFJ1340	30,3
440 a 450	GFJ450	217,7	1341 a 1344	RFJ1344	18,1
455 a 465	GFJ465	115	1345 a 1350	RFJ1350	12,6
470 a 480	GFJ480	6,4	1355 a 1375	RFJ1375	47,6
485 a 500	GFJ500	5,5	1380 a 1420	RFJ1420	68,7
525 a 575	GFJ575	21,5	1421 a 1424	RFJ1424	14,5
580 a 620	GFJ620	14,8	1425 a 1440	RFJ1440	28,5
625	GFJ625	0,2	1445 a 1485	RFJ1485	89,9
630 a 645	GFJ645	6,8	1490 a 1495	RFJ1495	11,5
693 a 722	GFJ722	26,1	1505 a 1515	RFJ1515	24,1
725 a 765	GFJ765	17,9	1520 a 1550	RFJ1550	57,5
766 a 784	FRJ784	30,9	1555 a 1595	RFJ1595	48,9
785 a 810	FRJ810	2,1	1596 a 1620	RFJ1620	28,0
811 a 820	RFJ820	11,6	1625 a 1670	RFJ1670	60,7
825 a 835	RFJ835	7,3	1700 a 1715	RFJ1715	14,6
845 a 850	RFJ850	5,9	1720 a 1735	RFJ1735	40,4
851 a 854	RFJ854	9,9	1740 a 1770	RFJ1770	25,2
855 a 870	RFJ870	23,7	1775 a 1795	RFJ1795	33,0
870 a 900	RFJ900	32,8	1796 a 1810	RFJ1810	58,6
901 a 905	RFJ905	3,9	1811 a 1830	RFJ1830	92,8
910 a 915	RFJ915	6,1	1831 a 1850	RFJ1850	19,3
916 a 925	RFJ925	7,9	1851 a 1900	RFJ1900	44,68
930 a 950	RFJ950	10,6	1901 a 1970	RFJ1970	71,3
951 a 959	RFJ959	11,7	1971 a 2147	RFJ2147	63,4
960 a 970	RFJ970	5,2	2148 a 3140	RFJ 3140	5,6
971 a 985	RFJ985	8,8	3141 a 3153	RFJ3153	2393,9

#### 4.22.5 Análises por Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS)

Os grupos de frações reunidas resultantes do refração da Fr. Hex de *T. phaeocarpa* GFJ10 e GFJ12, foram selecionadas para análises por GC-MS. As análises foram realizadas em sistema de cromatografia a gás GC-MS-QP2010 ULTRA (Shimadzu), contendo a biblioteca de dados espectrais NIST108 do programa LabSolution/GC-MS Solution, versão 4.20. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química, UFMG, sob orientação do Professor Dr. Diogo Vidal.

Para as análises, foi utilizado 1 mg de cada fração, solubilizada em 1 mL de hexano e adicionadas a tubos de vidros (*vials*). As análises foram realizadas em coluna capilar NST-05 com 0,25 mm de diâmetro e 30 m de comprimento, com fase estacionária composta por um filme de dimetilpolisiloxano (95%) e difenila (5%) com 0,25 µm de espessura (Restek). A temperatura do injetor empregada foi de 100 °C elevando-se a temperatura a cada 10 minutos até atingir a temperatura máxima de 325 °C, o fluxo de gás hélio foi de 0,79 mL/min, e o volume de injeção foi de 1,0 µL. A temperatura da interface e a fonte de íons do detector (impacto eletrônico a 70 elétron Volts) foram ajustadas para 250 °C. Para a identificação dos constituintes foi realizada a comparação entre os índices de retenção obtidos juntamente com a análise do espectro de massas e dados disponíveis no banco de dados NIST108, levando em consideração o percentual de similaridade superior a 85%.

#### 4.22.5.1 Determinação dos índices de retenção

Uma solução estoque contendo os hidrocarbonetos lineares de C<sub>9</sub> a C<sub>40</sub> foi preparada com concentração próxima a 10 ppm. Alíquotas contendo 1 µL da solução de hidrocarbonetos e 1 µL das amostras (1 mg/mL) foram analisadas por GC-MS. As injeções foram realizadas conforme o item 4.22.5. Os índices de retenção foram calculados com base no método proposto por van den Dool & Kratz, pela seguinte equação (2):

$$\text{IRL} = 100n + 100 \left[ \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \right]$$

**Equação 2:** Equação utilizada para obtenção do Índice de Retenção: onde: n= número de carbono do pico menos retido,  $t_{R(i)}$  é o tempo de retenção do analito,  $t_{R(n+1)}$  e  $t_{R(n)}$  são os tempos de retenção dos hidrocarbonetos de referência (padrão C<sub>9</sub> a C<sub>40</sub>) eluídos antes e depois do analito.

#### 4.22.6 Análises dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A identificação estrutural de dois sólidos RFJ900 e RFJ1135, resultantes do refractionamento da fração *n*-hexânica do extrato de *T. phaeocarpa* foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz) e de <sup>13</sup>C (100 MHz) e subespectros DEPT-135 (100 MHz). Os espectros foram obtidos pelo Dr. Wellerson Oliveira e pela Dra. Rosangela

Pereira no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em espectrômetro de RMN Bruker, modelo Ascend™ 400 MHz, à 25°C, empregando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Para solubilização das amostras utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.22.7 Refracionamento da Fr. EtOAc de *T. phaeocarpa*

O isolamento dos constituintes da fração EtOAc de *T. phaeocarpa*, que apresentou maior atividade antiviral (item 4.18), foi realizado por cromatografia em coluna de Sephadex LH20. Para tanto, utilizou-se coluna cromatográfica de vidro (55 × 4,6 cm d.i.) na qual se adicionou 100 g de Sephadex LH20 na forma de suspensão em etanol. Uma porção de 2 g da fração EtOAc foi totalmente solubilizada em 5 mL de MeOH, e esta foi depositada no topo da coluna com auxílio de uma pipeta graduada de 10 mL.

As frações foram coletadas com o auxílio de um coletor automático de frações. Cada tubo de ensaio recebeu aproximadamente 5 mL de eluato, correspondendo a cerca de 500 gotas. A eluição iniciou-se com 100% de EtOH de grau analítico, seguido de misturas de solventes em diferentes proporções, incluindo EtOH/acetona, acetona/MeOH, MeOH 100% e misturas de EtOH/H<sub>2</sub>O, conforme método descrito anteriormente por Campana (2014). A série eluotrópica utilizada está detalhada na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Gradiente de eluição em coluna de Sephadex LH20 empregada no refracionamento da Fr. EtOAc de *T. phaeocarpa*.

Eluente	Proporção	Volume (L)
EtOH	100%	1,5
EtOH/Acetona	90:10	1,0
EtOH/Acetona	70:30	1,2
EtOH/Acetona	1:1	1,0
EtOH/Acetona	20:80	1,0
Acetona/MeOH	1:1	1,0
MeOH	100%	0,5
EtOH/H <sub>2</sub> O	1:1	0,5
EtOH	100%	0,5

O fracionamento cromatográfico foi realizado com três porções de 2 g da fração EtOAc, totalizando 6 g da fração. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos. Esses perfis foram analisados inicialmente por CCD de sílica gel em placas de alumínio (DC - Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/UV 254) e as frações foram agrupadas de acordo com a semelhança na composição, conforme discriminado na **Tabela 8**. Posteriormente, as frações reunidas foram analisados por HPLC-PDA e UPLC-PDA-ESI-MS/MS (itens 4.22.2 e 4.22.3). Com base nos cromatogramas obtidos, algumas frações foram selecionadas para purificação por HPLC em escala preparativa.

**Tabela 8:** Agrupamento das frações resultantes do fracionamento da fração EtOAc de *T. phaeocarpa* em coluna de Sephadex LH20.

Solvente	Proporção	Massa (mg) 1ª coluna	Massa (mg) 2ª coluna	Massa (mg) 3ª coluna	Código
EtOH	100%	297,1	336,5	344,3	SFJ390
EtOH	100%	30,1	58,7	44,8	SFJ400
EtOH	100%	31,0	34,5	51,3	SFJ432
EtOH	100%	64,0	35,2	98,1	SFJ448
EtOH	100%	30,2	98,1	110,3	SFJ450
EtOH/Acetona	90:10	242,9	251,8	383,4	SFJ455
EtOH/Acetona	70:30	30,1	35,9	35,9	SFJ460
EtOH/Acetona	1:1	197,3	205,6	230,6	SFJ465
EtOH/Acetona	80:20	302,4	305	310,1	SFJ470
Acetona/MeOH	1:1	187,6	190,2	203,3	SFJ475
MeOH	100%	27,3	43,7	56,7	SFJ477
H <sub>2</sub> O/MeOH	1:1	59,8	47,8	44,8	SFJ480
<b>Total</b>	-	1.473,8	1642,8	1903,6	-
<b>Rendimento %</b>	-	73,7	82,1	95,2	-

#### 4.22.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em escala preparativa

As frações SFJ448 e SFJ432, obtidas a partir do refractionamento da fração EtOAc de *T. phaeocarpa* em coluna de Sephadex LH-20 (conforme descrito no item 4.22.7), foram selecionadas para o isolamento dos constituintes por HPLC em escala preparativa. Para cada

injeção, utilizaram-se 30 mg da fração, sendo realizadas 4 repetições para a fração SFJ432 e 8 repetições para a fração SFJ448. A seleção dessas frações baseou-se em seus perfis cromatográficos promissores em HPLC analítica, que indicaram a presença de constituintes majoritários.

#### 4.22.8.1 Preparo das amostras

Foram pesados 30 mg das frações SFJ448 e SFJ432 em tubos plásticos tipo *safe lock*. Para a solubilização, foram adicionados 1,5 mL de MeOH grau HPLC. As frações foram solubilizadas com auxílio do banho de ultrassom por 10 minutos. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm ( $6708 \times g$ ) por 10 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados com seringas descartáveis equipadas com agulhas, filtrados e transferidos para frascos de vidro (*vials*) com tampa. Por fim, os volumes totais de cada *vial* foram injetados automaticamente em sistema de HPLC em escala preparativa da marca Waters equipado com detector UV-Vis Waters 2489.

#### 4.22.8.2 Condições cromatográficas

O processo de fracionamento foi realizado em uma coluna Agilent Zorbax Prep-C18 (10  $\mu\text{m}$ ,  $250 \times 21,2$  mm d.i.), operando com detecção no UV nos comprimentos de onda de 210 nm e 350 nm e fluxo de 15 mL/min. A separação foi feita por eluição em gradiente, usando água purificada de grau 1 (solvente A) e acetonitrila grau HPLC (solvente B) em 30 min, iniciando a eluição com 80% de A e 20% de B, que foi gradualmente ajustada até atingir 95% de B, seguido de 15 min de reequilíbrio nas condições iniciais entre injeções subsequentes, conforme especificado na **Tabela 9**.

Os constituintes das frações SFJ448 e SFJ432 foram coletados manualmente em tubos Falcon de 50 mL devidamente identificados, mediante o acompanhamento de picos cromatográficos majoritários com tempos de retenção de 16,62 min (SFJ448) e 12,59 min (SFJ432), monitorados nos comprimentos de onda de 210 nm e 350 nm. Posteriormente, a acetonitrila foi removida sob pressão reduzida em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 40 °C, e as soluções aquosas restantes foram congeladas a -20 °C. Por fim, estas foram submetidas à liofilização para remoção da água, resultando em 24 mg de SFJ448 e 7 mg de SFJ432, que foram armazenados para caracterização posterior.

**Tabela 9:** Gradiente de eluição empregado no fracionamento por HPLC em escala preparativa.

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	80	20
20	75	25
25	5	95
30	5	95
32	80	20
45	80	20

#### 4.22.9 Análises cromatográficas por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para as subfrações SFJ448 e SFJ432

Para as subfrações SFJ448 e SFJ432, obtidas a partir do refracionamento do extrato etanólico de *T. phaeocarpa*, foram realizadas análises por UPLC-PDA-ESI-MS/MS, visando a caracterização de seus constituintes. O sistema de eluição consistiu em fase móvel A (água acidificada com 0,1% de ácido fórmico, v/v) e fase móvel B (acetonitrila grau HPLC acidificada com 0,1% de ácido fórmico, v/v) (**Tabela 10**). Empregou-se gradiente de eluição de 18 minutos, adaptado a partir das condições descritas por Gomes et al. (2021), com fluxo de 0,3 mL/min e volume de injeção de 7,0 µL.

**Tabela 10:** Gradiente de eluição estabelecido para obtenção do perfil fitoquímico das subfrações SFJ 448 e SFJ432.

Tempo (min)	%A*	%B*
0	95	5
13,00	5	95
15,00	5	95
16,00	95	5
18,00	95	5

\***Solvente A:** água acidificada com 0,1% de ácido fórmico; \***Solvente B:** acetonitrila grau HPLC acidificada com 0,1% de ácido fórmico.

#### **4.22.10 Análises dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para as substâncias QCT48 e AFZ32**

A identificação estrutural dos sólidos resultantes do refractionamento da fração EtOAc do extrato de *T. phaeocarpa* foi realizada a partir da análise dos espectros monodimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) e subespectros DEPT-135 (100 MHz) e bidimensionais (COSY, HMBC e HMQC). Os experimentos foram realizados pelo Prof. José Dias de Souza Filho no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em espectrômetro de RMN Bruker, modelo Ascend™ 600 MHz, à 25°C. Para solubilização das amostras utilizou-se metanol deuterado e DMSO deuterado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

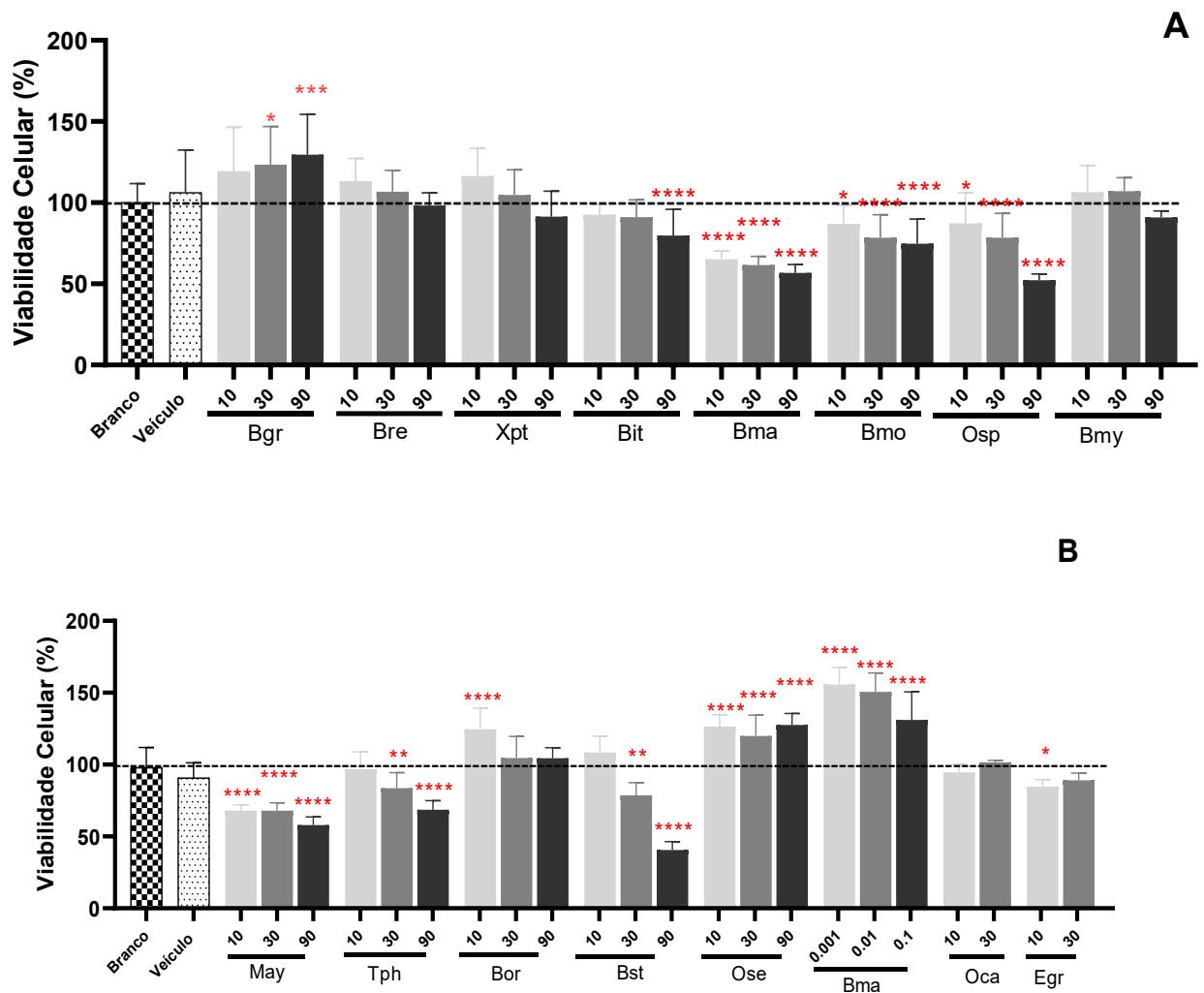
Os extratos submetidos à triagem de atividade antiviral foram obtidos na extratoteca do Laboratório de Fitoquímica. Estes extratos foram selecionados com base na composição química das espécies descrita na literatura, ou na composição química do gênero, priorizando-se plantas ricas em compostos polifenólicos, com potencial atividade contra o SARS-CoV-2 (PRASAD et al., 2020; KANDEIL et al., 2021; ANAND et al., 2021).

### 5.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais

Inicialmente avaliou-se a viabilidade celular da linhagem de fibroblasto murino L929 frente a diferentes concentrações dos extratos selecionados para estudo. Os ensaios foram realizados pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazolio) (ALLEY et al., 1998). Este é um ensaio colorimétrico considerado simples e rápido, capaz de gerar dados quantitativos (MORGAN, 1998). O fundamento bioquímico desse ensaio envolve a enzima oxidoredutase celular dependente de NAD(P)H que converte o sal tetrazólico MTT, de coloração amarela, em cristais insolúveis de (E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-1,3-difenilformazana, de coloração roxa (BAHUGUNA et al., 2017). Os cristais produzidos por meio da oxidorredução do tetrazólico são insolúveis em água, todavia, são solúveis em DMSO. Assim, a relação linear entre as células metabolicamente ativas e a cor produzida (roxo) permite uma quantificação precisa na taxa de morte e proliferação celular (LOOSDRECHT et al., 1994). Quando os valores de absorbância na quantificação são baixos, isso indica ausência de células viáveis.

Os extratos foram avaliados inicialmente nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL (**Figura 18 A e B**). O extrato de *Baccharis máxima* (Bma) apresentou viabilidade celular inferior a 80% nas três concentrações avaliadas e por isso ele foi ensaiado nas concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1 µg/mL (**Figura 18 B**). Adicionalmente, dos 15 extratos avaliados, somente seis (6) apresentaram viabilidade celular superior a 80% na concentração de 90 µg/mL (*Baccharis grandmucromata*, *Baccharis regnellii*, *Xyris pterygoblephara*, *Baccharis oreophila*, *Ouratea semiserrata* e *Baccharis myriocephala*). Dessa forma, selecionou-se para avaliação da atividade antiviral as concentrações de 10 e 30 µg/mL e, para as espécies *Ouratea casteneifolia*, e *Echinodorus grandiflorus*, avaliadas posteriormente, o ensaio de citotoxicidade foi realizado somente com as concentrações de 10 e 30 µg/mL.

Tendo em vista que os extratos das espécies *B. grandmucromata*, *B. regnellii*, *B. itatiaiae*, *B. maxima*, *B. montana*, *B. myriocephala*, *B. stylosa*, *B. oreophila*, *O. castaneifolia*, *E. grandiflorus*, *O. spectabilis*, *O. semiserrata* e *T. phaeocarpa* apresentaram viabilidade igual ou superior a 80% para as células L929 nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , exceto para a *B. maxima* (0,001, 0,01 e 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) a atividade antiviral *in vitro* desses extratos foi avaliada em células L929 infectadas com o coronavírus murino MHV-3, utilizando as concentrações supracitadas.



**Figura 18:** Viabilidade celular dos extratos (10, 30 e 90  $\mu\text{g/mL}$ ) avaliada em células L929. Células L929 ( $1 \times 10^4$  células/poço) cultivadas em DMEM suplementada com 7% FBS foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h, a viabilidade celular foi medida pela metabolização do MTT determinada por espectrofotometria em 570 nm. Os resultados obtidos são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média dos valores (%), comparados com o grupo veículo (L929 + EtOH + DMSO) (\* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  - ANOVA com

pós teste Dunnett). **A:** Bgr (*Baccharis grandmucromata*); Bre (*Baccharis regnellii*); Xpt (*Xyris pterygoblephara*), Bit (*Baccharis itatiaiae*); Bmo (*Baccharis montana*); **B:** May (*Maytenus ilicifolia*); Tph (*Terminalia phaeocarpa*); Osp (*Ouratea spectabilis*); Bmy (*Baccharis myriocephala*); Bor (*Baccharis oreophila*); Bst (*Baccharis stylosa*); Ose (*Ouratea semiserrata*); Bma (*Baccharis máxima*); Oca (*Ouratea Castaneifolia*); Egr (*Equinodorus grandiflorus*).

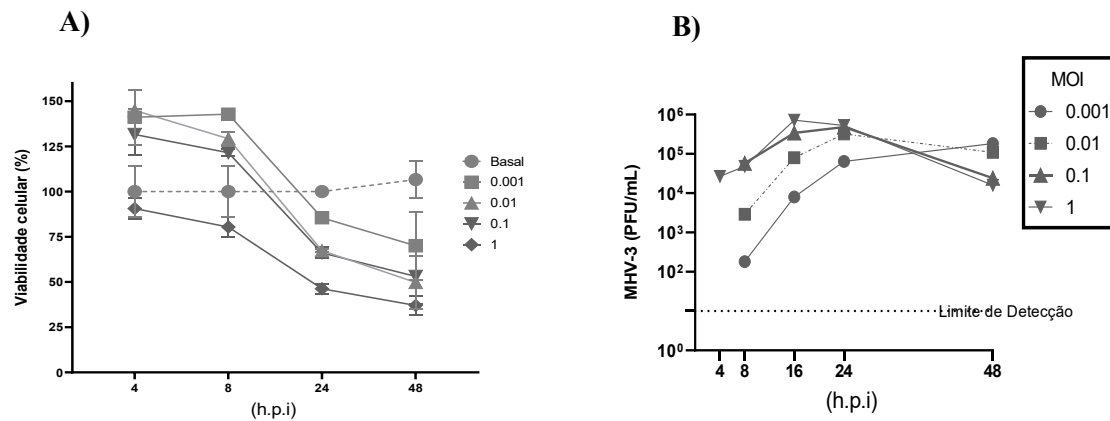
Os testes de citotoxicidade são determinantes para avaliar a toxicidade intrínseca e extrínseca de constituintes de extratos vegetais (ANYWAR et al., 2018). Por esse motivo, é fundamental realizar a avaliação da citotoxicidade dos extratos na linhagem celular utilizada nos ensaios de atividade antiviral, a fim de assegurar que a inibição do título viral observado se deve efetivamente à redução do título viral induzida por constituintes do extrato, e não pela morte celular resultante de citotoxicidade.

## 5.2 Determinação da Multiplicidade de Infecção e avaliação da atividade antiviral

Para realizar a avaliação da atividade antiviral dos extratos frente ao MHV-3 *in vitro*, inicialmente determinou-se o título do estoque viral em  $8,16 \times 10^6$  PFU/mL. A partir do título viral da solução estoque de MHV-3 avaliou-se diferentes valores de multiplicidade de infecção (MOI), utilizando os tempos de 4, 8, 16, 24, 48 horas, a fim de selecionar a MOI a ser empregada nos ensaios. A MOI é a razão pela qual o vírus é adsorvido, anexado ou infectado em alvos suscetíveis, variando em função do número de agentes infectantes e com o tempo em que eles permanecem em contato com o alvo suscetível à infecção (ABEDON; BARTOM, 2013).

Para esses ensaios utilizou-se a linhagem de células de fibroblasto murino L929. A escolha das células de fibroblasto murino como células hospedeiras para esses estudos foi crucial, uma vez que essa linhagem celular demonstra uma alta susceptibilidade à infecção pelo vírus MHV-3. Isso torna essas células um modelo relevante e apropriado para investigações relacionadas à replicação e inibição do vírus avaliado. A viabilidade das células L929 infectadas com o MHV-3 com as MOIs de 1,0; 0,1; 0,01 e 0,001, representada na Figura 18A, mostra redução de células viáveis entre 8 e 24 h pós infecção para todas as concentrações de inóculo. A viabilidade celular das células L929 infectadas pelo MHV-3 em diferentes MOIs foi avaliada pelo método do MTT. Semelhantemente, o ensaio de Unidade Formadora de Placa – PFU, nos mostra que, entre 8 e 16 h pós-infecção houve um aumento de partículas virais e pico de

infecção no tempo de 16 h para a MOI 1,0 (**Figura 19A**), enquanto para as MOIs 0,1, 0,01 e 0,001 o pico de partículas virais foi em 24 h (**Figura 19B**).

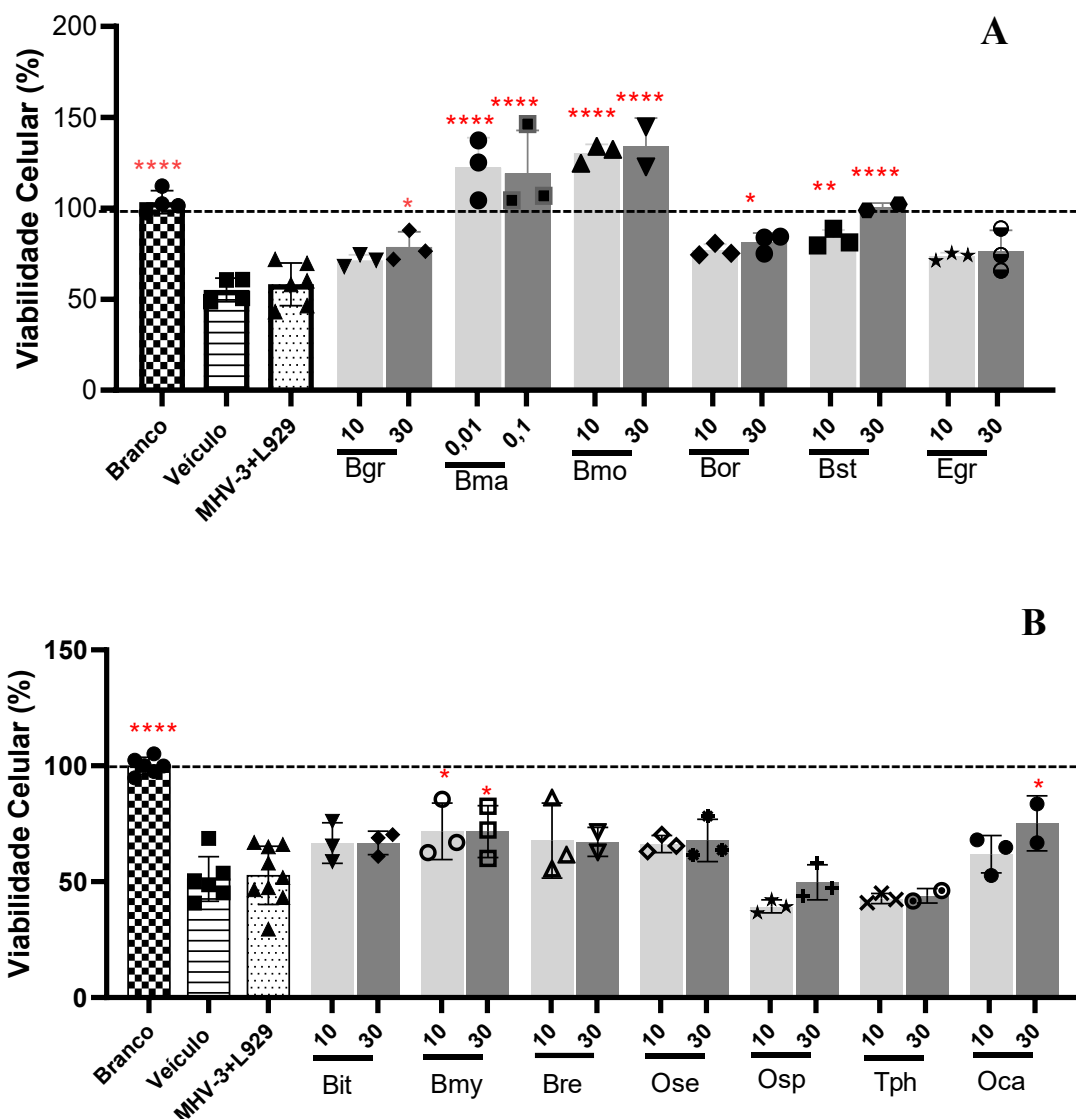


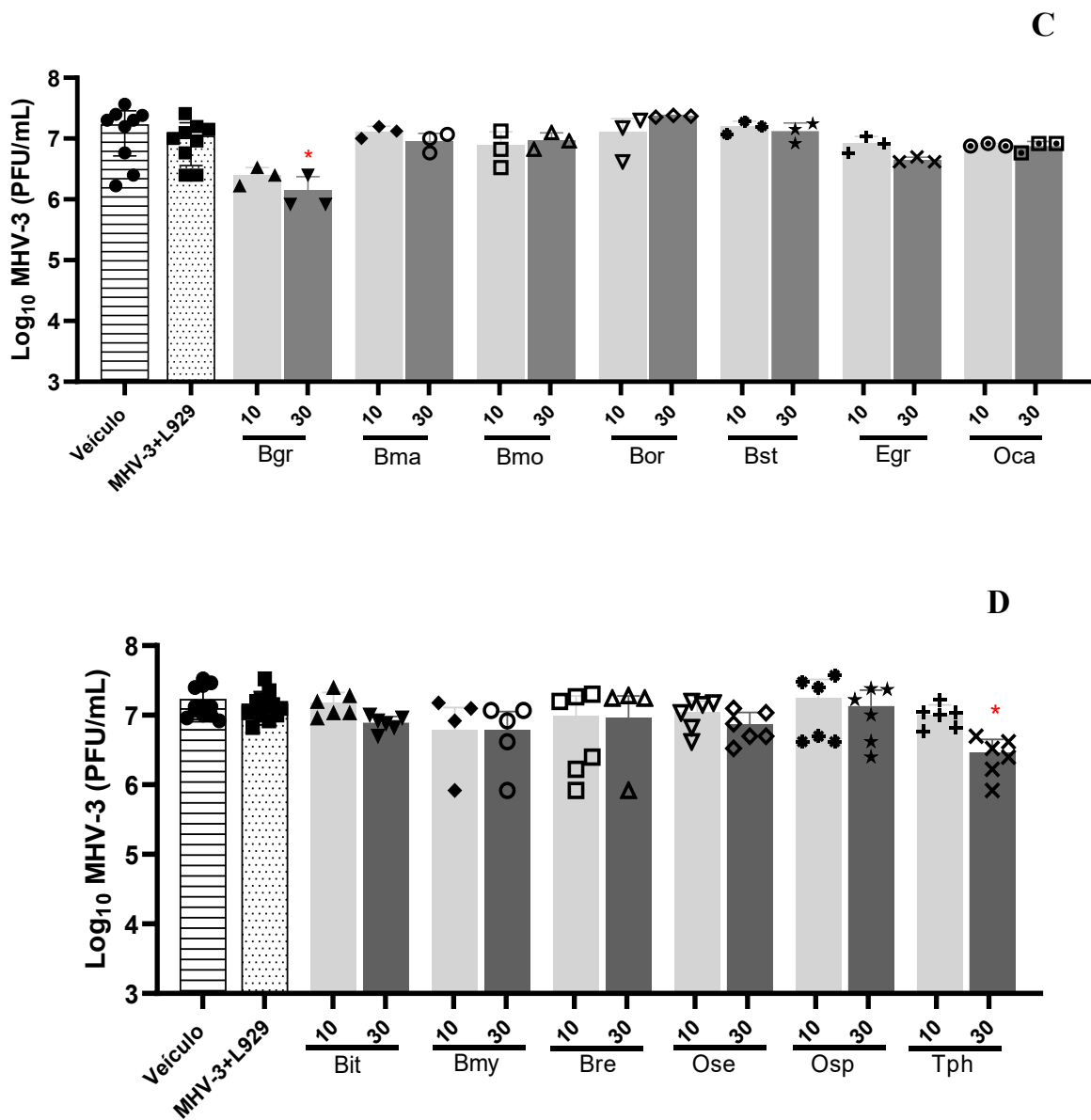
**Figura 19:** Curva de multiplicação de MHV-3 em fibroblastos murinos L929. Células L929 ( $10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços, sendo infectadas com diferentes índices de multiplicação para MHV-3. Em tempos pré-determinados (4, 8, 24 e 48 h após a infecção – h.p.i) foram determinadas **A)** viabilidade celular e **B)** a produção viral foi avaliada por ensaio de formação de placas de lise em células L929, a partir da titulação dos sobrenadantes coletados. Os experimentos foram realizados com triplicatas biológicas, cada uma com três replicatas experimentais.

Com base nesses resultados, o intervalo de 16 horas e a MOI de 0,01 foram definidos para a realização dos ensaios antivirais, no intuito de utilizar menor quantidade de vírus com tempo capaz de infectar uma determinada quantidade de células desejadas, com aproximadamente 80% de viabilidade celular, tendo em vista que, após 16 horas de infecção a viabilidade celular se apresentou abaixo de 75% (**Figura 19A**). De acordo com Mistry e colaboradores (2018), a quantidade de partículas virais deve ser distribuída de acordo com quantidade de célula hospedeira depositada ao poço. Dependendo da cepa do vírus e do protocolo experimental utilizado, valores baixos de MOI têm alta probabilidade de infecção bem-sucedida (MISTRY et al., 2018).

Na sequência, avaliou-se a atividade antiviral dos extratos em concentrações não citotóxicas previamente determinadas em células L929 infectadas com o coronavírus murino MHV-3. A viabilidade das células infectadas e tratadas com os extratos foi avaliada pelo ensaio do MTT (**Figura 20 A e B**) e o título viral foi determinado pelo ensaio de formação de placas

de lise (PFU – unidade formadoras de placas) (**Figura 20 C e D**). A triagem inicial foi realizada em triplicata experimental para todos os extratos considerados não citotóxicos. Como resultados desses ensaios, cujos dados estão dispostos na **Figura 20 C e D**, os extratos de *B. grandmucromata* e *T. phaeocarpa* se mostraram promissores frente ao MHV-3, por apresentarem significativas reduções na formação de placas de lise quando comparadas ao veículo (MHV-3+EtOH+DMSO). Com intuito de obter reprodutibilidade da atividade antiviral das espécies mencionadas anteriormente, foi realizado a duplicata biológica com triplicata experimental.



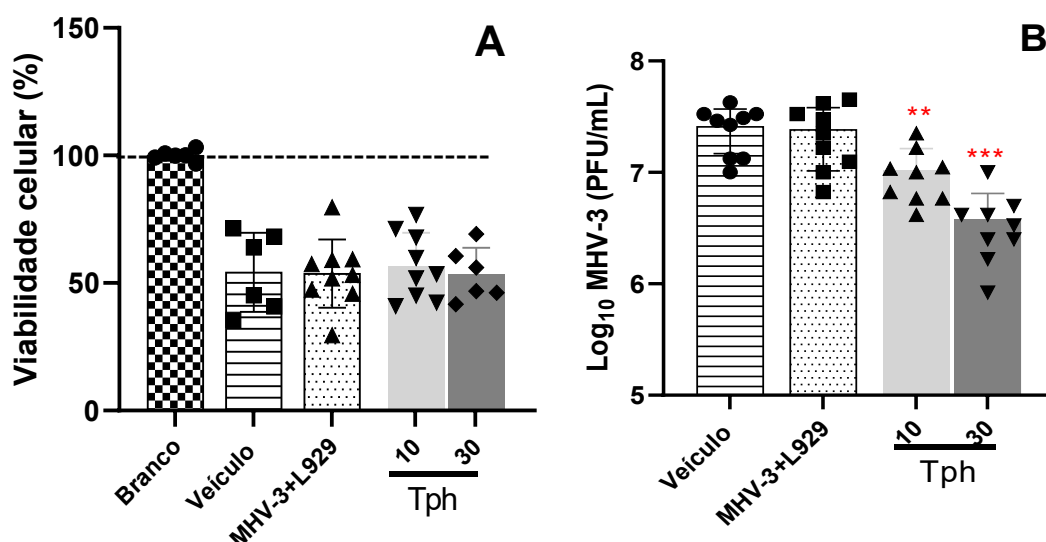


**Figura 20: A e B)** Viabilidade de células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com extratos. Células L929 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e infectadas com MHV-3, procedendo-se ao tratamento com extratos das espécies Bgr: *Baccharis grandmucromata* ; Bma: *Baccharis maxima*; Bmo: *Baccharis montana* ; Bor: *Baccharis oreophila* ; Bit: *Baccharis stylosa* ; Egr: *Echinodorus grandiflorus*; Oca: *O. casteneifolia* ; Bit: *Baccharis itatiaiae* ; Bmy: *Baccharis myriocephala* ; Bre: *Baccharis regnellii*; Ose: *Ouratea semiserrata*; Osp: *Ouratea spectabilis* ; Tph: *Terminalia phaeocarpa*, por 16 h.p.i. A viabilidade celular foi medida pela metabolização do MTT em 570 nm. Os dados obtidos são expressos em percentagem (%), comparados com o controle veículo não infectado (MHV-3 + EtOH + DMSO) (\* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós

teste de Dunnet. **C e D**) Ensaio de formação de placas em células de fibroblasto murino (L929) infectadas com coronavírus murino MHV-3 frente ao tratamento com extratos brutos. Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células L929 ( $1 \times 10^5$  células/poço) infectadas com MHV-3 (MOI 0,01) e titulados na mesma linhagem celular. Os dados obtidos são expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL) e comparados com o grupo veículo (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós teste de Tukey.

Os resultados apresentados na **Figura 20C e 20D** possibilitaram identificar dois extratos ativos: *B. grandmucromata* (redução de 0,12 e 0,27 log do título viral, nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) e *T. phaeocarpa* (redução do título viral de 0,46 e 0,51 log, nas concentrações de 10 e 30  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Os extratos reduziram o título viral e não reduziram a viabilidade celular das células infectadas e tratadas, quando comparado ao grupo veículo (MHV-3+ EtOH+DMSO). Como o extrato de *T. phaeocarpa* apresentou maior redução de título viral nos ensaios iniciais, os experimentos foram repetidos com este extrato a fim de confirmar os resultados obtidos, sendo realizados com triplicatas biológicas, cada uma delas com três repetições (**Figura 21A**).

Os ensaios realizados possibilitaram confirmar a atividade antiviral de *T. phaeocarpa* frente ao MHV-3 (**Figura 21B**). O extrato de *T. phaeocarpa* reduziu o título viral de forma dependente da concentração, quando comparado ao veículo (MHV-3 + EtOH+DMSO), observou-se, também, que o extrato não recuperou a viabilidade das células infectadas pelo vírus; todavia, não houve citotoxicidade adicional nas células ensaiadas, indicando que o extrato não agravou a citotoxicidade induzida pelo vírus. A ausência de recuperação da viabilidade celular sugere que o extrato testado não foi capaz de neutralizar ou reverter os danos que o vírus causou às células hospedeiras. Assim sendo, o extrato de *T. phaeocarpa* apresentou, portanto, efeito antiviral significativo, tendo em vista que, o título viral do MHV-3 recuperado foi reduzido quando comparado ao grupo veículo (MHV-3 + EtOH+ DMSO).



**Figura 21:** **A)** Viabilidade de células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com extrato de *T. phaeocarpa*. Células L929 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e infectadas com MHV-3, procedendo-se ao tratamento com extrato de *T. phaeocarpa*. **B)** Ensaio de formação de placas de lise em células de fibroblasto murino (L929) infectadas com coronavírus murino MHV-3 frente ao tratamento com extrato de *T. phaeocarpa*. Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células L929 ( $1 \times 10^5$  células/poço) infectadas com MHV-3 (MOI 0,01) e na sequência titulados na mesma linhagem celular. Os dados obtidos são expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL) e comparados com o veículo (MHV-3 + EtOH + DMSO) (\*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós teste de Tukey.

Extratos vegetais e seus constituintes isolados apresentam potencial para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, tendo em vista a diversidade química dos metabólitos secundários. Dessa forma, produtos naturais de plantas têm ganhado cada vez mais destaque como fontes alternativas para a identificação de agentes antivirais. Neste contexto, a triagem de plantas selecionadas com base em critério quimiosistemático vem sendo adotada em diferentes estudos na busca por compostos com atividade antiviral. A seleção das espécies avaliadas neste estudo foi guiada por uma abordagem quimiosistemática. Foram priorizadas plantas para as quais haviam relatos prévios de atividade antiviral e/ou anti-inflamatória, bem como espécies reconhecidas pela presença de polifenóis complexos e/ou com padrão de oxigenação pouco usual e/ou ricas em triterpenos, flavonoides e esteroides. Esses critérios orientaram a escolha dos extratos vegetais submetidos à triagem antiviral frente ao MHV-3.

Do total de treze (13) extratos vegetais avaliados, dois (2) extratos foram ativos na triagem realizada em células L929 frente ao vírus MHV-3, promovendo redução do título viral de 0,93 a 2,64 log nas concentrações de 10 e 30 µg/mL, respectivamente, para o extrato de *T. phaeocarpa* (**Figura 21B**). Ou seja, aproximadamente 15% dos extratos testados possuem atividade antiviral frente ao vírus MHV-3. Vale ressaltar que até o momento não existem triagens de extratos vegetais frente a cepa MHV-3 relatadas na literatura; todavia, existem relatos de espécies vegetais ativas frente a outras linhagens de MHV. A exemplo disso, no estudo de Kim e colaboradores (2010) foi realizada triagem com dezenove (19) extratos metanólicos frente aos vírus MHV-A59 e MHV-JHM. Desse total, três extratos foram ativos frente a linhagem MHV-A59 e MHV-JHM, representando 16% de extratos ativos. Os valores de CE<sub>50</sub> relatados variaram de 0,8 a 3,7 µg/mL e a CC<sub>50</sub> variando de 156,5 a 556,8 µg/mL (KIM et al., 2010). Em outro estudo de Kim e colaboradores (2008), os autores realizaram a triagem de 22 extratos vegetais frente ao vírus MHV-A59, sendo 5 deles ativos, correspondendo a 22% do total.

Outros estudos também avaliaram o potencial de extratos vegetais em triagens realizadas frente a diferentes vírus que causam doenças respiratórias. Uma triagem foi realizada com 15 extratos vegetais frente ao vírus da Influenza A, responsável por provocar infecções no trato respiratório humano; desse total, dois extratos se apresentaram ativos, *Pittosporum viridiflorum* e *Rapanea melanophloeos*, correspondendo a 15%, com redução média do título viral de 7,4 e 5 logs, respectivamente (MEHRBOD et al., 2018). Por sua vez, no estudo de Li et al. (2005), realizou-se uma triagem com 200 extratos vegetais frente ao SARS-CoV. Deste total, 4 extratos se apresentaram ativos, correspondendo a 2%, com valores de CE<sub>50</sub> variando de 2,4 ± 0,2 a 88,2 ± 7,7 µg/ml. Semelhantemente, foi realizado triagem com sete (7) extratos vegetais frente ao vírus da Síndrome Reprodutiva e Respiratória Suína (PRRS), vírus responsável por causar insuficiência reprodutiva e pneumonia; na avaliação, dois (2) extratos se apresentaram ativos na concentração de 625 µg/ml, correspondendo a 28% do total avaliado (ARJIN et al., 2020). Os estudos apresentados avaliaram a capacidade de diferentes extratos vegetais em inibir a replicação de vírus responsáveis por doenças respiratórias, semelhantemente ao que ocorre com o vírus MHV-3 em camundongos por infecção intranasal.

Os relatos supracitados reforçam que triagem de plantas em busca de possíveis fontes de agentes antivirais tem conduzido à identificação de potentes inibidores da replicação viral *in vitro*, o que, por sua vez, aumenta a probabilidade de encontrar novos compostos bioativos de origem vegetal.

### 5.3 Fracionamento do extrato de *T. phaeocarpa*

A fim de identificar os constituintes antivirais de *T. phaeocarpa*, presentes no extrato etanólico da espécie, este foi submetido a fracionamento preliminar por partição entre solventes imiscíveis, originando as frações *n*-hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica (item 4.10). Os rendimentos (% m/m) das frações obtidas nesse trabalho foram distintos dos valores relatados anteriormente, conforme dados apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11:** Fracionamento do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* por partição entre solventes imiscíveis: rendimentos percentuais massa/massa (% m/m) obtidos e comparação com rendimentos relatados anteriormente por Gomes (2021).

Frações	Rendimento (% m/m) <sup>a</sup>	Rendimento (%m/m) <sup>b</sup>
<i>n</i> -hexânica	22,9	17,5
Diclorometânica	7,5	2,3
Acetato de etila	25,5	19,2
Hidrometanólica	32,6	47,0
Percentual recuperado	88,5	86,0

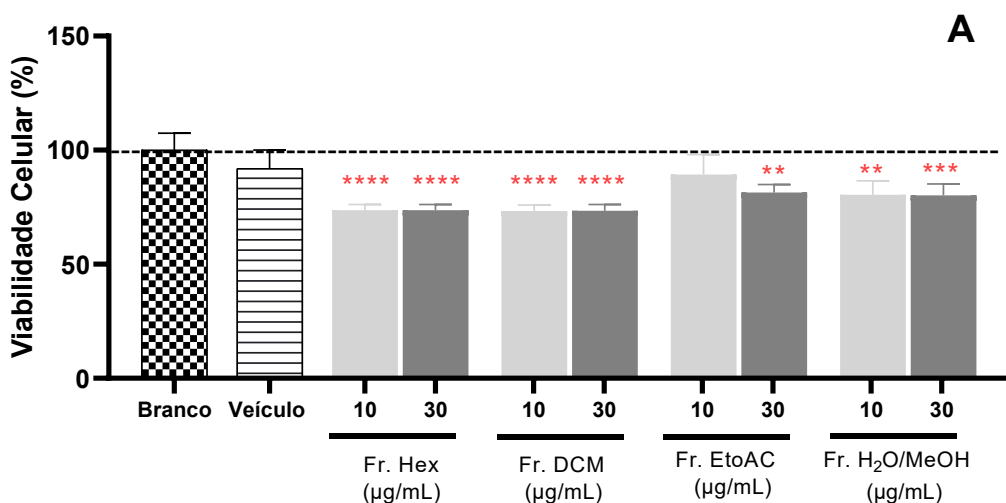
<sup>a</sup>Rendimento percentual obtidos no presente trabalho, <sup>b</sup>Rendimento percentual obtido por Gomes (2021).

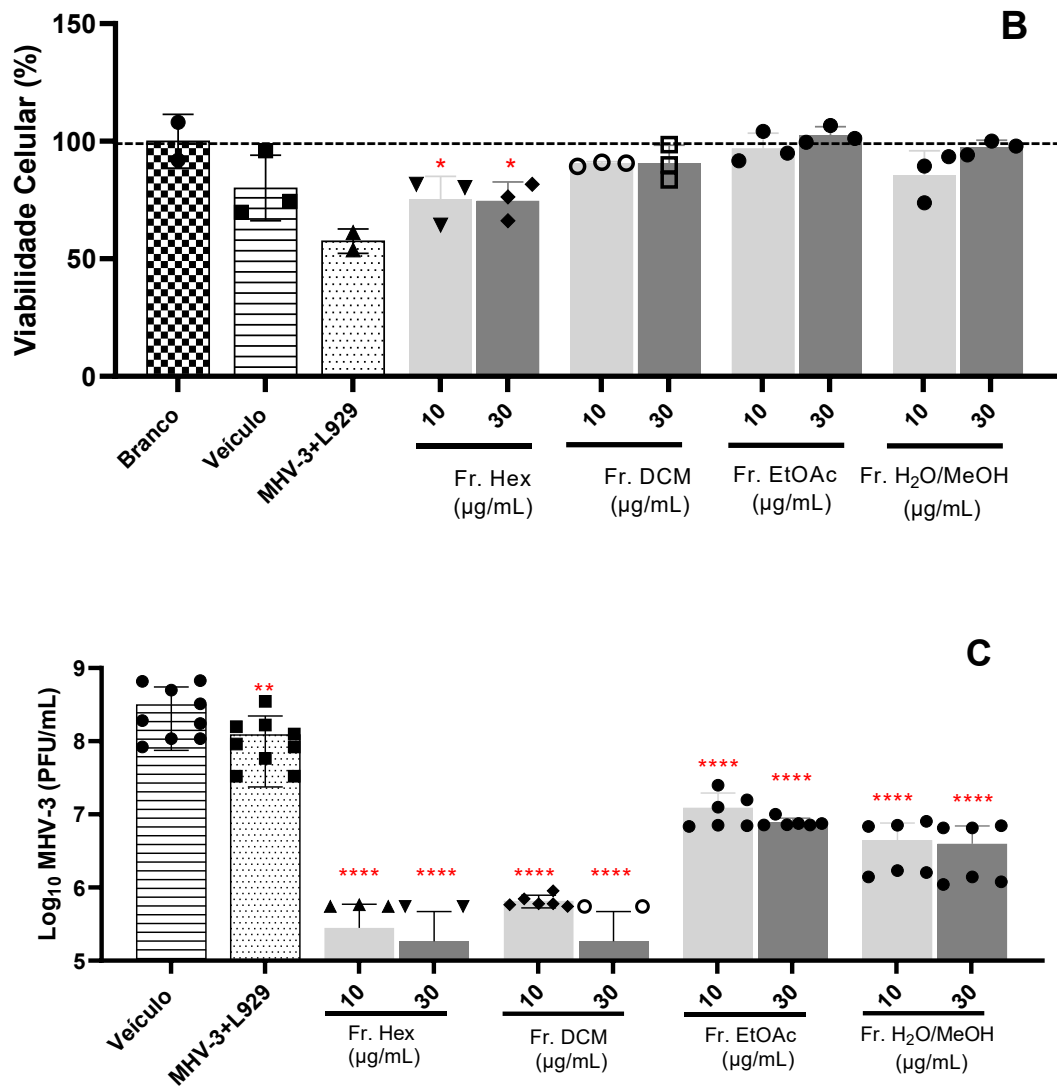
#### 5.3.1 Avaliação da atividade antiviral das frações obtidas do extrato de *T. phaeocarpa*

Os resultados apresentados são correspondentes a ensaios de duplicatas biológicas, com triplicatas experimentais. A atividade antiviral das frações obtidas foi avaliada em células L929 infectadas com MHV-3. Para tanto, avaliou-se inicialmente a viabilidade celular na linhagem de fibroblasto murino L929 frente as concentrações 10 e 30 µg/mL das frações *n*-hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica obtidas (**Figura 22A**). Todas as frações apresentaram viabilidade igual ou superior a 80% para as células L929 nas concentrações ensaiadas. Posteriormente avaliou-se a viabilidade celular das células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com as frações, bem como o título viral recuperado do sobrenadante das placas do experimento realizado (**Figura 22B e 22C**). Todas as frações apresentaram atividade

antiviral dependente da concentração e não reduziram a viabilidade celular das células infectadas e tratadas nas concentrações testadas, quando comparado ao veículo (MHV-3+DMSO+Etanol). Além disso, os resultados obtidos sugerem que as frações não apenas inibiram a replicação do vírus, como também reverteram a citotoxicidade induzida pela infecção viral. Os resultados obtidos indicaram maior atividade antiviral para as frações *n*-hexânica e diclorometânica, que reduziram em grande extensão a formação de placas de lise nas concentrações ensaiadas (3,1 e 2,8 log de inibição viral na concentração de 10 µg/mL e 3,3 log de inibição na concentração de 30 µg/mL, respectivamente) e não apresentaram toxicidade para as células L929 (**Figura 22 B e C**).

As frações hexânicas concentram compostos de baixa polaridade, como hidrocarbonetos e terpenos, entre outros (SILVA et al., 2010). No presente trabalho, tanto a fração *n*-hexânica quanto a fração diclorometânica apresentaram redução significativa dos títulos virais de MHV-3 em relação ao controle infectado. É provável que a atividade esteja relacionada com a presença de terpenos e esteroides, conforme será discutido no item 5.8. Compostos pertencentes a essas classes, tais como glutinol,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -sitosterol, identificados em frações lipofílicas de espécie de *Terminalia*, apresentaram atividade antiviral contra o Zika vírus (PEREIRA 2021).

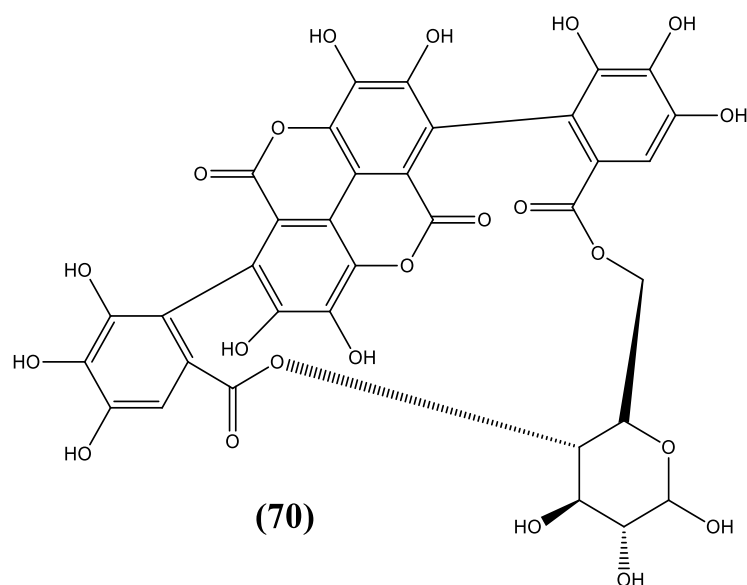
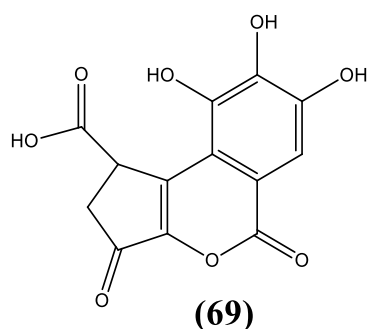


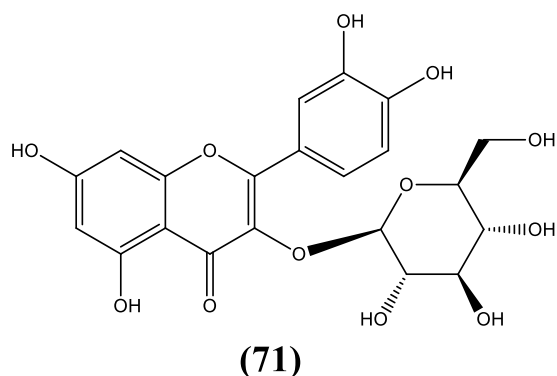


**Figura 22:** Atividade antiviral das frações resultantes do fracionamento do extrato de *T. phaeocarpa* por partição entre solventes imiscíveis. **A)** Viabilidade celular das frações (10 e 30 µg/mL) avaliada em células L929. **B)** Viabilidade de células L929 infectadas com MHV-3 e tratadas com frações de *T. phaeocarpa*. Células L929 ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e infectadas com MHV-3, procedendo-se ao tratamento com as frações. A viabilidade celular foi medida pela metabolização do MTT em 570 nm. Os dados obtidos são expressos em percentagem (%), comparados com o veículo não infectado (\* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós teste de Dunnet. **C)** Ensaio de formação de placas em células de fibroblasto murino (L929) infectadas com coronavírus murino MHV-3 frente ao tratamento com frações de *T. phaeocarpa*. Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células L929 ( $1 \times 10^5$  células/poço) infectadas com MHV-3 (MOI 0,01) e titulados em células L929. Os dados obtidos são expressos em unidades formadoras de placas

por mililitro (PFU/mL) e comparados com o grupo veículo (MHV-3+EtOH+DMSO) (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós teste de Tukey. Fr. EtOAc: fração Acetato de Etila; Fr. MeOH/H<sub>2</sub>O: fração Hidrometanólica; Fr. DCM: fração Diclorometânica; Fr. Hex: fração *n*-hexânica.

É relevante ressaltar que a composição química de *T. phaeocarpa* foi investigada em somente um estudo anterior (Gomes et al., 2021). Segundo os autores, a composição química do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* compreende diversos polifenóis, incluindo ácidos fenólicos como o ácido brevifolincarboxílico (69), elagitaninos como a punicalina (70) e flavonoides como a rutina (71) (Gomes et al., 2021). Conforme descrito nos itens 5.7 e 5.8, a investigação da composição química da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* resultou na identificação de hidrocarbonetos, triterpeno e esteróide.





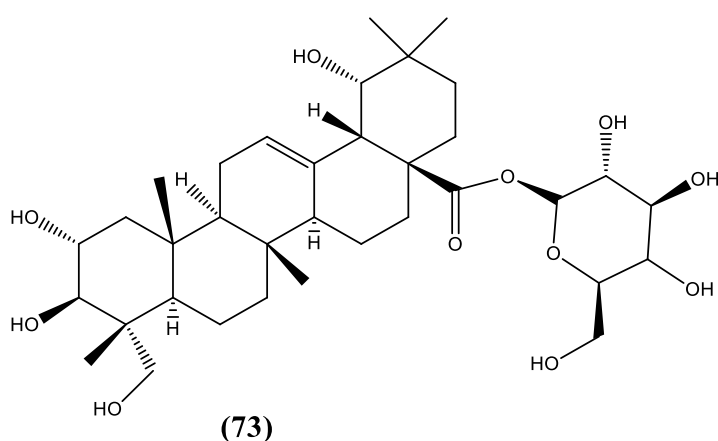
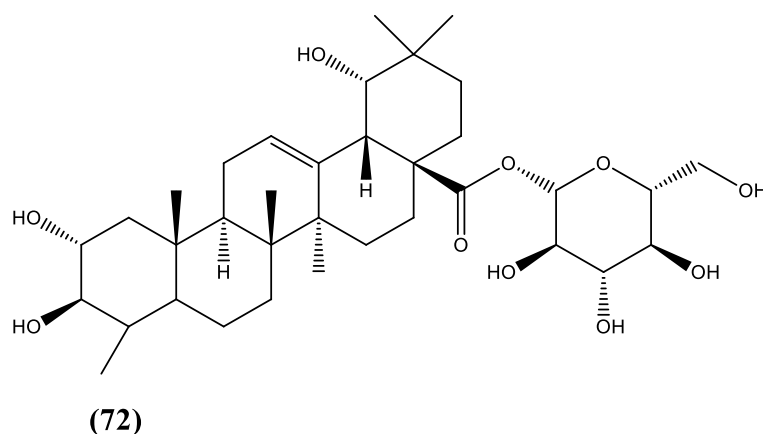
Na revisão da literatura realizada não foram encontrados relatos da atividade antiviral de *T. phaeocarpa* frente a *betacoronavírus*. Até o momento, a atividade antiviral de *T. phaeocarpa* foi relatada frente ao Zika vírus em células Vero CCL-81 e SH-SY5Y (PEREIRA et al., 2022). Neste estudo, o extrato etanólico de folhas de *T. phaeocarpa* reduziu significativamente a formação de placas de lise de Zika vírus, com valores de  $CC_{50}$  de  $22,0 \pm 6,8$   $\mu\text{g/mL}$  em células Vero CCL-81 e  $104,8 \pm 28,9$   $\mu\text{g/mL}$  em células SH-SY5Y. Todavia, conforme descrito na revisão da literatura (item 3.10), diversas espécies de *Terminalia* vêm sendo estudadas frente a diferentes vírus (PANYA et al., 2021; OGBOLE et al., 2018; VALSARAJ et al., 1997; OYUNTSESEG et al., 2014).

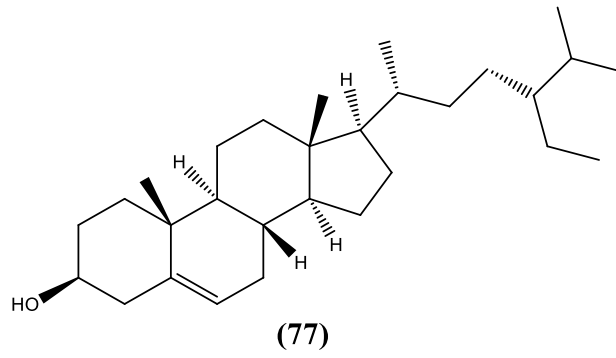
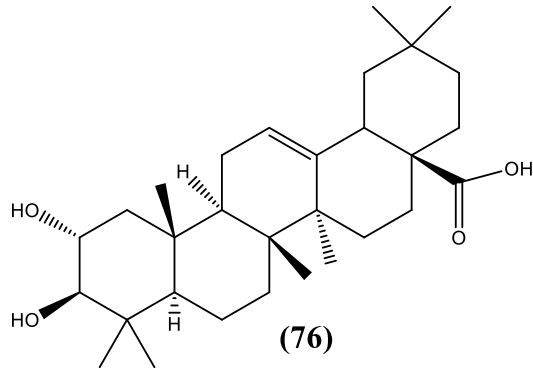
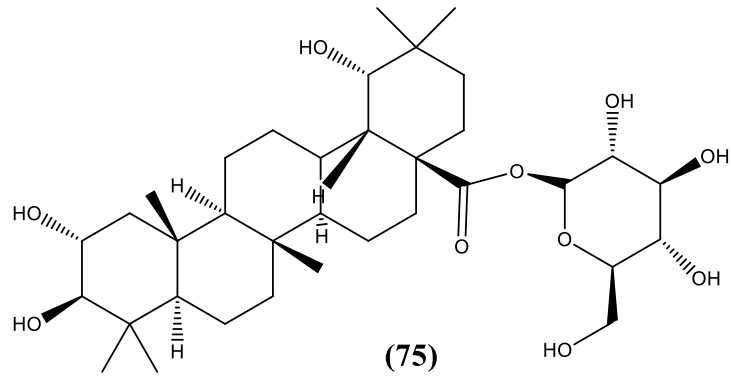
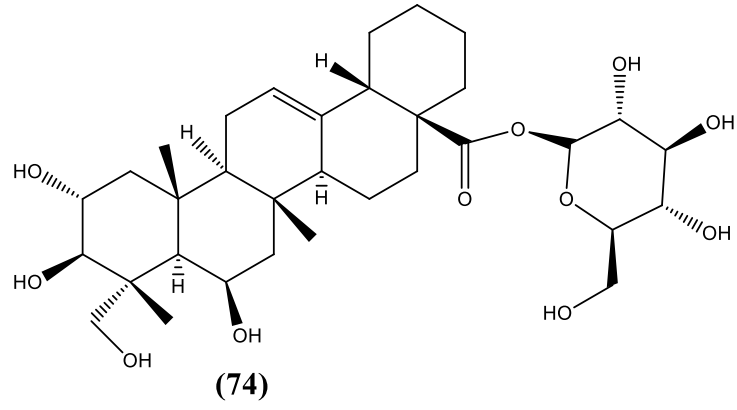
A exemplo disso, a espécie *T. chebula* é reconhecida por sua atividade antiviral de amplo espectro, uma vez que demonstrou eficácia contra diversos tipos de vírus. De acordo com Li et al. (2020), extratos de frutos verdes e maduros da espécie foram avaliados em células MDCK infectadas com o vírus da Influenza A, com valores de  $CE_{50}$  de  $5,8 \pm 1,4$   $\mu\text{g/mL}$  para os extratos de frutos verdes e  $7,0 \pm 1,0$   $\mu\text{g/mL}$  para os extratos de frutos maduros. A atividade de *T. chebula* foi avaliada frente ao vírus da doença de Newcastle - hemaglutinina neuramidase (NDV-HN) em células de rim de hamster (BHK), nas concentrações de 6,3, 12,5, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  (LEE, 2011). O extrato inibiu a adsorção celular da glicoproteína NDV-HN na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (LEE, 2011).

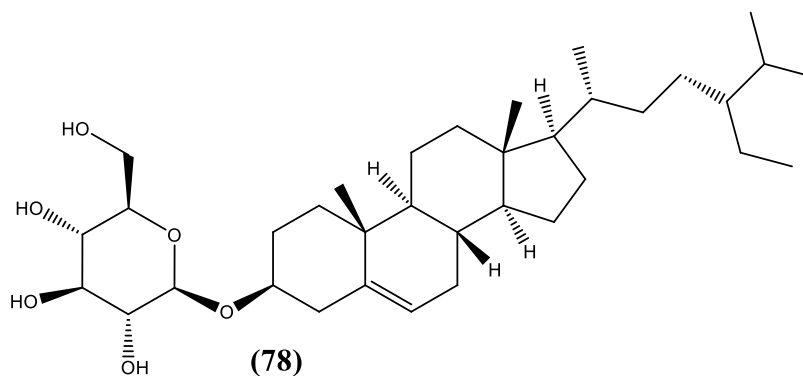
Adicionalmente, em um ensaio *in silico* realizado com 22 constituintes de *T. chebula*, foi observado que cinco triterpenos, a saber, arjunetina (72), arjunglicosídeo I (73), chebulosídeo I (74), belericosídeo (75) e ácido maslínico (76), juntamente com os esteróis  $\beta$ -sitosterol (77) e daucosterol (78) apresentaram valores mais elevados de energia de interação nos cálculos de acoplamento molecular com a protease principal (Mpro) do SARS-CoV-2. Esses resultados sugerem que essas substâncias têm potencial ação inibitória da replicação viral (GHOSH et al., 2022).

Reforçando a atividade antiviral associada ao gênero *Terminalia*, Arumugam e colaboradores (2020) conduziram uma investigação fitoquímica das cascas e folhas de *T. arjuna*. A arjunetina (72) foi isolada do extrato etanólico das cascas e ensaios *in silico* sugerem que ela se ligue à protease do SARS-CoV-2 (3CL, PL e RdRP) com valores de energia de ligação significativamente elevados, indicando potencial atividade antiviral.

Estes relatos destacam a importância de explorar a atividade antiviral de extratos e constituintes menos polares de espécies de *Terminalia*. Isso se torna evidente quando consideramos que, no presente estudo, foi identificada que as frações *n*-hexânica e diclorometânica de *T. phaeocarpa* induziram maior redução do título viral do vírus MHV-3.





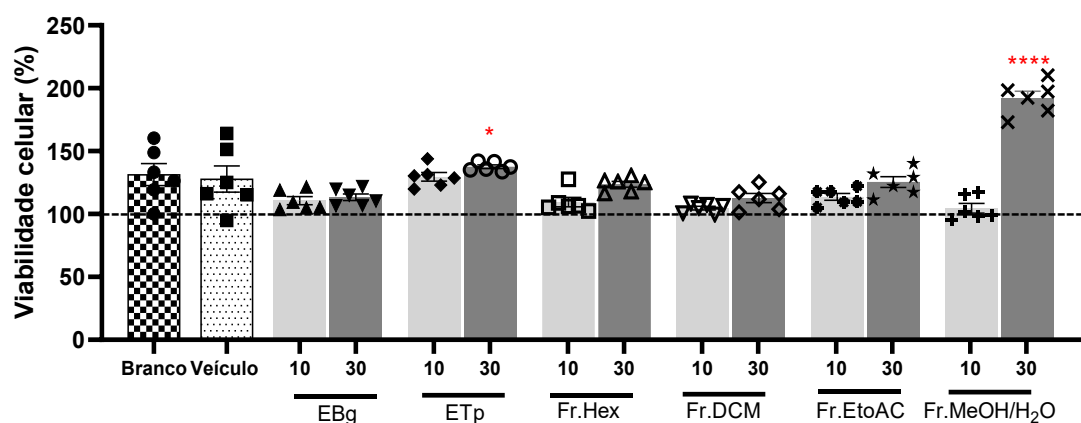


#### 5.4 Avaliação da atividade anti-SARS-CoV-2 *in vitro* de extratos e frações selecionadas

Na sequência do trabalho, os extratos e frações identificados como ativos frente ao vírus MHV-3, foram avaliados frente ao SARS-CoV-2. Conforme mencionado anteriormente, esta abordagem visou utilizar o MHV-3 como um modelo para a triagem de extratos com potencial atividade contra o SARS-CoV-2, realizando-se o ensaio com o *betacoronavírus* humano somente dos extratos e ativos. Adicionalmente, esta abordagem possibilita identificar compostos ou extratos que tenham amplo espectro de atividade antiviral, atingindo diferentes tipos de coronavírus (HELENO et al., 2023).

A triagem de atividade antiviral dos 13 extratos frente ao coronavírus murino MHV-3 revelou dois extratos ativos: *B. grandmucromata* e *T. phaeocarpa*. O último apresentou maior atividade e foi fracionado por partição entre solvente imiscíveis, observando-se atividade antiviral para todas as frações obtidas (*n*-hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica). Tendo em vista que o MHV-3 foi utilizado como modelo para o SARS-CoV-2, na sequência do trabalho, os extratos e frações supracitados tiveram sua atividade antiviral avaliada frente ao coronavírus humano em laboratório com nível de biossegurança NB-3.

Inicialmente avaliou-se a viabilidade das células Calu-3 – células epiteliais do trato respiratório humano empregadas no ensaio – após o tratamento com os extratos e as frações. Os resultados apresentados na **Figura 23** indicam que os extratos e frações não foram citotóxicos, obtendo-se viabilidade celular superior a 80% nas concentrações avaliadas.



**Figura 23:** Viabilidade celular dos extratos etanólicos de *B. grandmucromata* e *T. phaeocarpa* e frações (10 e 30 µg/mL) avaliada em células Calu-3. Células Calu-3 ( $1 \times 10^4$  células/poço) cultivadas em DMEM suplementada com 10% FBS foram semeadas em placas de 96 poços. Após 24 h, a viabilidade celular foi medida pela metabolização do MTT determinada por espectrofotometria em 570 nm. Os resultados obtidos são apresentados como médias  $\pm$  erro padrão da média dos valores (%), comparados com o grupo veículo (EtOH + DMSO) (\* $p < 0,5$ , \*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  - ANOVA com pós teste Dunnett). Fr. EtOAc: fração acetato de etila; Fr. MeOH/H<sub>2</sub>O: fração hidrometanólica; Fr. DCM: fração diclorometânica; Fr. Hex: fração *n*-hexânica.

Os ensaios de atividade antiviral foram realizados em duplicata biológica, cada uma delas com triplicatas experimentais, em células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2. As células Calu-3 são conhecidas por expressar a enzima conversora de angiotensina II (ECA2), que é um receptor específico utilizado pelo vírus SARS-CoV-2 para a ligação e fusão com a célula hospedeira. A presença do receptor para ECA2 nas células Calu-3 torna essas células valiosas em estudos de infecção viral e pesquisa sobre o processo de entrada do vírus em células hospedeiras.

Como resultado, observou-se que os extratos de *B. grandmucromata* (0,54 e 0,84 log de inibição do título viral) e *T. phaeocarpa* (1,01 e 1,52 log de inibição do título viral), bem como todas as frações obtidas do extrato de *T. phaeocarpa* (Fr. Hex 1,19 e 1,26 log; Fr. DCM 1,54 e 1,97 log; Fr. EtOAc 1,49 e 1,98 log; Fr. MeOH/H<sub>2</sub>O 1,11 e 0,88 log) apresentaram atividade antiviral dependente da concentração e não reduziram a viabilidade celular das células infectadas e tratadas, quando comparados ao veículo (SARS-CoV-2+EtOH+DMSO).

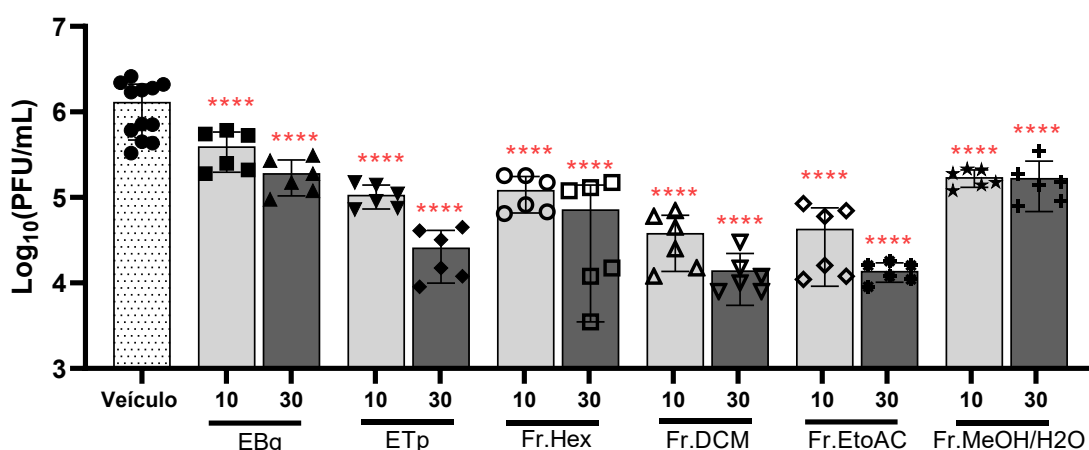
Acredita-se que as células infectadas por vírus citopáticos enfrentem uma morte celular iminente logo após a infecção. Essa eliminação celular pode ser desencadeada tanto como consequência da replicação viral quanto como uma resposta do sistema imunológico à infecção. No entanto, é importante notar que, em alguns casos, a infecção viral pode adotar uma abordagem não lítica, onde a célula hospedeira não é imediatamente destruída (HEATON, 2017). Isso ocorre para preservar a função de órgãos ou tecidos nos quais a regeneração é lenta ou limitada, garantindo assim que as funções vitais sejam mantidas (HEATON, 2017). Tendo em vista que não se observou redução da viabilidade das células Calu-3 infectadas pelo SARS-CoV-2 e tratadas com o extrato e as frações de *T. phaeocarpa*, pode-se inferir que o tratamento bloqueou ou reduziu os mecanismos de morte celular, ou que esta redução foi decorrente da redução da carga viral.

Os resultados obtidos indicam maior atividade antiviral para as frações DCM e EtOAc (1,54 e 1,49 log de inibição viral na concentração 10 µg/mL, 1,97 e 1,98 log inibição na concentração de 30 µg/mL, respectivamente), que aboliram a formação de placas de lise nas concentrações e diluições ensaiadas (10 e 30 µg/mL e nas diluições de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) e ausência de toxicidade para as células Calu-3, diferentemente do observado nos ensaios frente ao MHV-3, nos quais as frações mais ativas foram a *n*-hexânica (3,1 log de inibição na concentração de 10 µg/mL e 3,3 log de redução na concentrações de 30 µg/mL testadas) e a diclorometânica (2,8 log na concentração de 10 µg/mL e 3,3 log de redução na concentrações de 30 µg/mL) (**Figura 24**).

Esses resultados indicam que os receptores específicos presentes em cada tipo celular devem influenciar o mecanismo pelo qual as substâncias bioativas podem inibir a entrada e a replicação viral na célula hospedeira. No entanto, as diferenças observadas entre as atividades antivirais frente ao MHV-3 e ao SARS-CoV-2 não podem ser atribuídas apenas às variações nos receptores das células hospedeiras (antígeno carcinoembrionário em células L929 e enzima conversora de angiotensina 2 – ECA2 – em células Calu-3). Deve-se considerar também que os dois vírus pertencem a diferentes espécies de betacoronavírus e apresentam estruturas virais e proteínas de superfície distintas, especialmente nas proteínas de ligação ao receptor e nas proteínas acessórias envolvidas na fusão e replicação viral (RAHIMIAN et al, 2023; GARCIA et al., 2021). O MHV-3 utiliza principalmente a proteína spike (S) para interagir com o antígeno carcinoembrionário murino (mCEACAM1a), enquanto o SARS-CoV-2 reconhece a ECA2 humana através de um domínio de ligação (RBD) estruturalmente diferente (GRUPTA et al, 2024; GARCIA et al., 2021). Assim, as diferenças conformacionais e químicas entre essas

proteínas virais podem alterar significativamente o modo de interação das substâncias ativas, influenciando tanto a afinidade de ligação quanto o local de ação dos compostos presentes nas frações.

Além disso, os mecanismos de replicação e as proteínas não estruturais envolvidas na síntese do RNA viral também variam entre os dois vírus, o que pode contribuir para diferentes alvos moleculares e, conseqüentemente, distintos perfis de sensibilidade aos compostos testados. Dessa forma, a maior atividade antiviral observada nas frações de menor polaridade contra o MHV-3 e nas frações de média a alta polaridade contra o SARS-CoV-2 reflete não apenas diferenças nas células hospedeiras, mas também a diversidade estrutural e funcional entre os vírus, que influencia diretamente a interação vírus-composto.



**Figura 24:** Ensaio de formação de placas em células epiteliais do trato respiratório humano (Calu-3) infectadas com coronavírus humano SARS-CoV-2 frente ao tratamento com extratos e frações. Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células Calu-3 ( $1,5 \times 10^5$  células/poço) infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) e titulados em células Vero E6. Os dados obtidos são expressos em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL) e comparados com ao veículo (SARS-CoV-2+EtOH+DMSO) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). ANOVA com pós teste de Tukey. Fr. EtOAc: fração acetato de etila; Fr. MeOH/H<sub>2</sub>O: fração hidrometanólica; Fr. DCM: fração diclorometâmica; Fr. Hex: fração *n*-hexânica.

É importante destacar que, até o momento, não se tem conhecimento sobre relatos da atividade antiviral de *B. grandmucromata* e *T. phaeocarpa* frente aos coronavírus MHV-3 e SARS-CoV-2. Dessa forma, é possível inferir que a atividade antiviral observada nas frações

de média e alta polaridade frente ao SARS-CoV-2 seja decorrente da presença de compostos fenólicos, amplamente relatados na literatura como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). Essa hipótese é sustentada pela similaridade estrutural entre a ECA e a ECA2, que compartilham aproximadamente 40% de identidade e 60% de similaridade (LUBBE et al., 2020; SCIALO et al., 2020). Considerando que a ECA2 atua como receptor celular para o SARS-CoV-2, é factível supor que compostos inibidores da ECA podem também inibir a ECA2, reduzindo a ligação viral e a subsequente infecção celular.

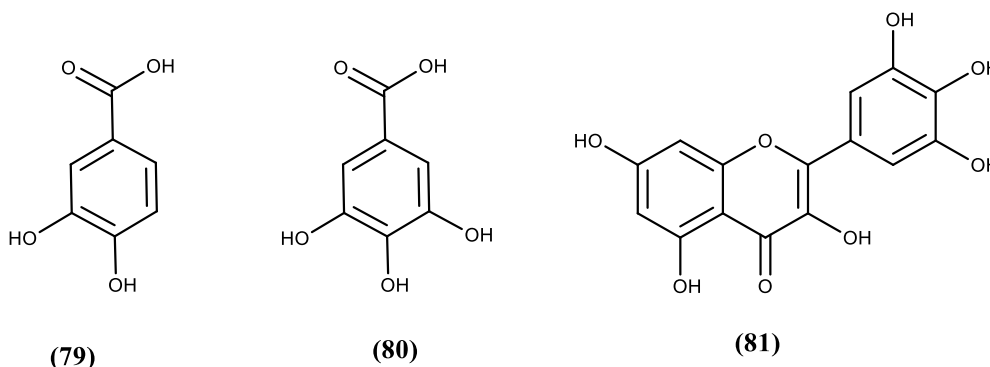
Como mencionado anteriormente, Gomes e colaboradores (2021) identificaram no extrato de *T. phaeocarpa* um total de 38 metabólitos secundários, incluindo polifenóis complexos, elagitaninos e flavonoides, compostos de média a alta polaridade. Dentre eles, destacam-se os ácidos tânico, protocatecuico (**79**), gálico e elágico (**80**), que demonstraram em ensaio *in silico* a capacidade de inibir a ECA em uma faixa de concentrações entre 2,1 e 9,3 mM. Além disso, o flavonoide quercetina apresentou atividade inibitória sobre a ECA, com valores de  $CE_{50}$  variando entre 0,415 e 1,381 mM (SHUKOR et al., 2013). Considerando que a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) atua como receptor celular para o SARS-CoV-2, mediando a ligação da proteína viral Spike à célula hospedeira, é plausível supor que compostos capazes de inibir a ECA também apresentem afinidade pela ECA2, interferindo no processo de entrada viral. Dessa forma, os dados obtidos sugerem que as substâncias já identificadas em *T. phaeocarpa* representam potenciais candidatas para o desenvolvimento de terapias antivirais direcionadas à inibição da interação entre a ECA2 e o SARS-CoV-2 (MUCHTARIDI et al., 2020).

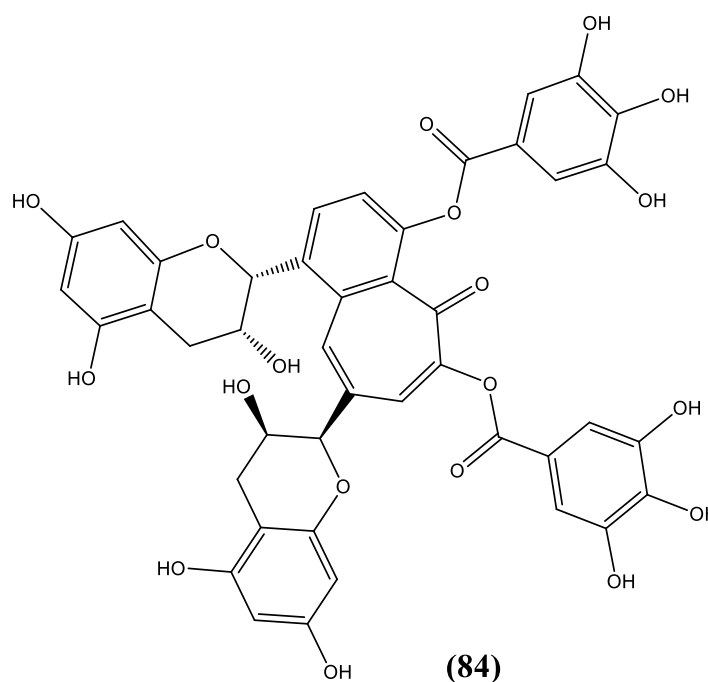
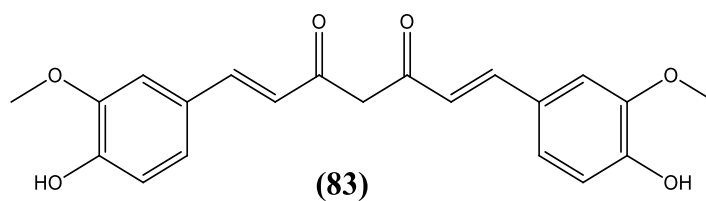
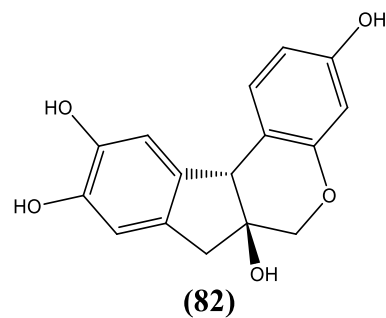
Diversos estudos avaliaram o potencial de compostos polifenólicos e outros compostos em ensaios *in silico* direcionados a esse alvo específico. Essa abordagem visa identificar compostos que possam atuar como inibidores da ECA2. Assim, a miricetina (**81**) e a quercetina, também identificadas em *T. phaeocarpa* (GOMES et al., 2021), apresentaram energias de ligação de -7,59 e -7,58 kcal/mol com a ECA2, respectivamente, sugerindo forte afinidade com a enzima (GULER et al., 2021). Resultados semelhantes foram observados para o ácido gálico e a quercetina, revelando uma afinidade de ligação com a ECA2 (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2021). De forma semelhante, a corilagina também identificadas em *T. phaeocarpa*, apresentou um valor de dissociação de equilíbrio (KD) de 1,39  $\mu$ M na interação com a ECA2, demonstrando possuir a capacidade de estabelecer interações significativas com proteína viral Spike-RBD e o receptor celular ECA2 (YANG et al., 2021).

Outros compostos fenólicos, como a 1,2,3,4,6-pentagaloiil glicose, também demonstraram interação direta com a ECA2. No estudo de Chen et al. (2021), a KD para a interação entre a ECA2 e a 1,2,3,4,6-pentagaloiil glicose foi determinada em 22,2  $\mu$ M, indicando que essa molécula possui a capacidade de se ligar de forma específica ao receptor. Adicionalmente, às interações moleculares previamente mencionadas, mostraram que a quercetina e a curcumina exibem elevada afinidade de ligação à ECA2, com energias de -115,16 e -141,36 kcal/mol, respectivamente, reforçando de maneira substancial a potencial atividade antiviral desses dois compostos como inibidores da entrada viral (MAURYA et al., 2020).

A quercetina e o ácido elágico também apresentaram energias de ligação de -7,4 e -7,5 kcal/mol, respectivamente com a Mpro do SARS-CoV-2. Os autores concluíram que os compostos são potenciais inibidores da protease principal do vírus, limitando assim a maturação viral (SHALDAM et al., 2021). Semelhantemente, o ácido elágico também apresentou energia de ligação à 3CLpro do SARS-CoV-2 de -8,0 kcal/mol, indicando que o ácido elágico tem uma forte capacidade de se unir à proteína viral em um local crucial para a atividade do vírus (UMAR et al., 2022).

Não só os constituintes identificados em *T. phaeocarpa*, mas outros compostos isolados de espécies vegetais diversas tiveram sua atividade inibitória relatada frente a ECA ou ECA-2: isosakuranetin-5-*O*-rutinosídeo neoeriocitrina e um glicosídeo da luteolina (GUTIÉRREZ-ROMÁN et al., 2020), coretincone e taxifolina (WANG et al., 2014), epigallocatequina galato, isobavachalcona e ácido salvianólico A (ZHANG et al., 2021), brasilina (82), curcumina (83) e theaflavina-3,3'-digalato (84), (GOC et al., 2021).



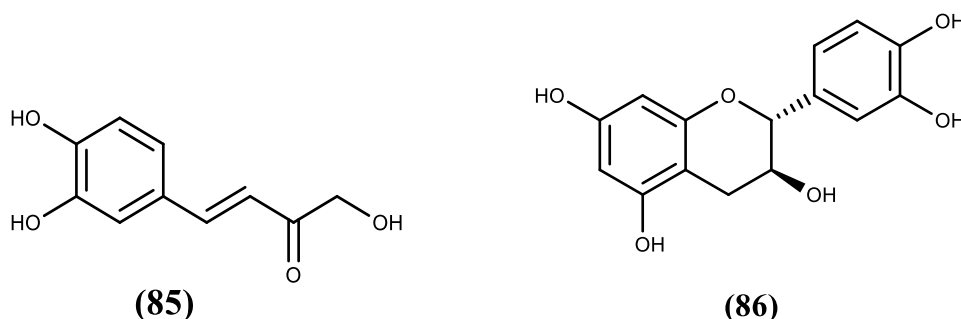


Estudos *in vitro* também demonstraram o potencial anti-SARS-CoV-2 de compostos polifenólicos e de outros compostos bioativos de plantas (ABUBAKAR et al., 2021; GASPAROTTO JUNIOR et al., 2021; GOC et al., 2021). Entre os constituintes de *T. phaeocarpa*, o ácido tânico mostrou potencial atividade antiviral de forma concentração-dependente no intervalo de 1 a 10  $\mu\text{M}$  ao inibir a infecção pelo SARS-CoV-2 em células embrionárias de rim humano 293T e Vero E6 (WANG et al., 2020). Já a punicalagina, em ensaios com linhagem de células Vero E6 infectadas com o SARS-CoV-2, apresentou  $\text{CE}_{50}$  de  $7,20 \pm 1,08 \mu\text{M}$  na inibição da formação de placas virais (DU et al., 2021). Outros polifenóis

amplamente relatados, como o ácido elágico, a curcumina e a quercetina, inibiram a protease principal (3CLpro) do SARS-CoV-2 com valores de  $CE_{50}$  de 11,8, 11,9 e 23,4  $\mu\text{M}$ , respectivamente (BAHUN et al., 2021).

Além da inibição direta da entrada ou replicação viral, diversos compostos polifenólicos previamente identificados em *T. phaeocarpa* apresentam atividade antiviral frente a outros vírus (COELHO-DOS-REIS, et al., 2011; CARVALHO et al., 2013). O ácido cafeico (85) e a punicalagina demonstraram atividade frente ao vírus da Influenza A (UTSUNOMIYA et al., 2018; LI et al., 2020), enquanto a catequina (86) e o ácido gálico atuaram na inibição da neuraminidase e da replicação do RNAm viral (LI et al., 2020). Já os ácidos quínico, cafeico e protocatecuico mostraram-se ativos contra o vírus da hepatite B (WANG et al., 2009; ZHOU et al., 2007). Outro polifenol de destaque identificado como constituinte da *T. phaeocarpa* é a quercetina, cuja atividade antiviral foi confirmada em estudo clínico frente ao SARS-CoV-2. O uso de 1000 mg (dose diária) reduziu significativamente os níveis séricos de fosfatase alcalina, proteína C reativa e lactato desidrogenase. (SHOHAN et al., 2022). Esses resultados sugerem que a quercetina possui um potencial benefício no tratamento ou na redução da gravidade da infecção por SARS-CoV-2, com base na diminuição desses marcadores séricos associados à inflamação e à lesão celular.

Assim, com base nas evidências químicas e farmacológicas disponíveis, é possível afirmar que *T. phaeocarpa* representa uma fonte promissora de metabólitos secundários bioativos, especialmente compostos polifenólicos, com potencial de atuação sobre múltiplos alvos virais, incluindo a ECA2 e a protease principal do SARS-CoV-2. Essa multiplicidade de mecanismos sugere que as frações de maior polaridade possam conter substâncias relevantes para o desenvolvimento de novos agentes antivirais naturais.



### 5.5 Determinação de CC<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e IS para o extrato de *T. phaeocarpa* e suas frações

A identificação de atividade antiviral do extrato de *T. phaeocarpa* e suas frações contra os vírus MHV-3 e o SARS-CoV-2 é um dado relevante, tendo em vista, que esses compostos têm o potencial de inibir a replicação viral de dois diferentes *betacoronavírus*. Na sequência do trabalho, estas amostras foram selecionadas para determinação da Concentração Citolóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) utilizando a linhagem de célula L929, com objetivo de estimar a margem de segurança entre a concentração citotóxica para as células e a concentração que inibe 50% do vírus (CE<sub>50</sub>). O extrato e frações foram avaliados em oito concentrações dentro da faixa inibitória das amostras (810, 270, 90, 10, 3,33, 1,11 e 0,37 µg/mL). Os resultados obtidos nesse ensaio desempenham um papel fundamental na identificação de potenciais efeitos tóxicos do extrato sobre as células, que podem ser erroneamente interpretados como atividade antiviral (BARROS et al., 2012).

Os valores de CC<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e IS obtidos para o extrato bruto de *T. phaeocarpa* e para as respectivas frações (Hex, DCM, EtOAc e MeOH) estão organizados na **Tabela 12**. Nela, observa-se que o extrato apresentou IS = 3,15, enquanto as frações demonstraram maior seletividade com IS = 6,40 para Hex, IS = 6,33 para DCM, IS = 6,14 para EtOAc e IS = 4,74 para H<sub>2</sub>O/MeOH (**Figura 25**).

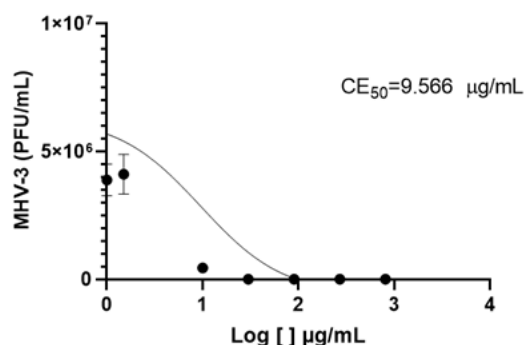
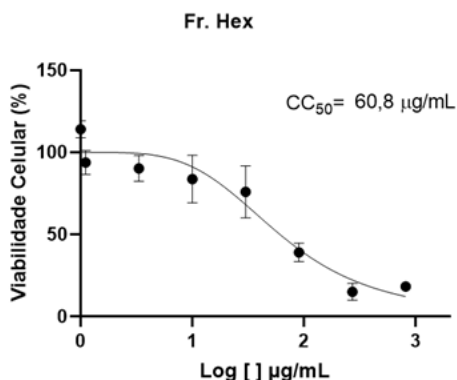
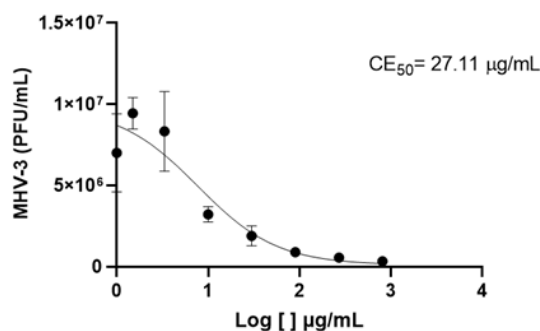
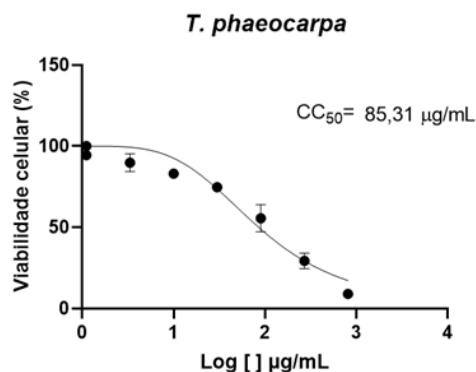
**Tabela 12:** Valores de CC<sub>50</sub>, CE<sub>50</sub> e IS do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* e de suas frações frente ao MHV-3

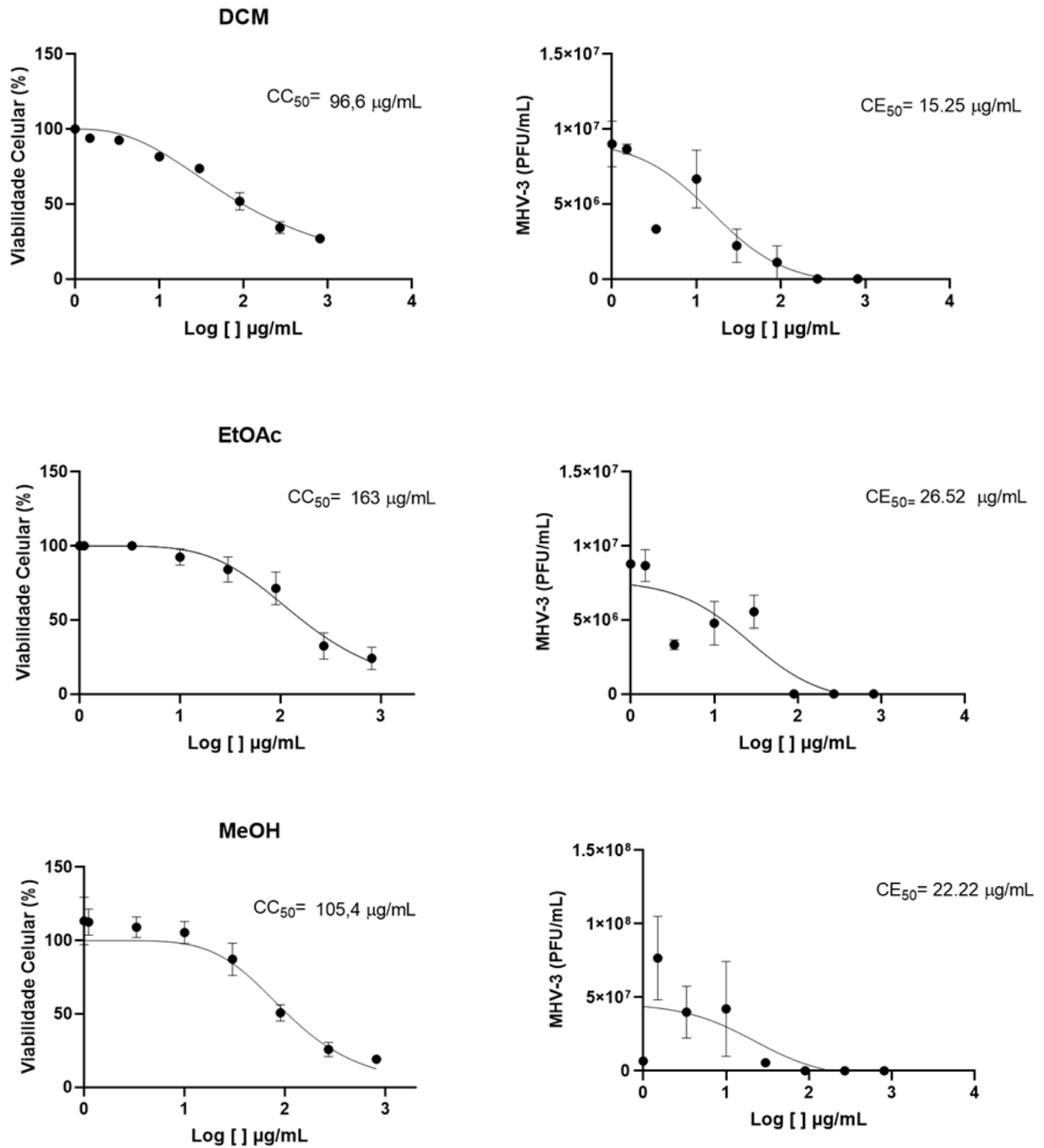
Amostra	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	IS
Extrato Etanólico <i>T. phaeocarpa</i>	85,31	27,11	3,15
Fração Hex	60,80	9,56	6,40
Fração DCM	96,60	15,25	6,33
Fração EtOAc	163,00	26,52	6,14
Fração (H <sub>2</sub> O/MeOH)	105,40	22,22	4,74

É imprescindível que compostos que apresentem atividade antiviral *in vitro* não induzam efeitos citotóxicos. O extrato e frações ensaiados apresentaram citotoxicidade baixa,

mostrando que não afetam o crescimento das células. Os valores de  $CE_{50}$  obtidos indicam que os extratos apresentam significativa atividade antiviral, posto que valores de  $CE_{50}$  inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$  para extratos e inferiores a 25  $\mu\text{M}$  para substâncias são considerados promissores (COS et al., 2006). É também importante lembrar que quanto maior for o valor do IS mais segura será a substância ou extrato (COS et al., 2006; TOLARDO, 2019). A literatura preconiza valores de IS superiores a 3 para considerar promissor produtos naturais com atividade antiviral (MEHRBOD et al., 2018).

Portanto, o extrato e as frações de *T. phaeocarpa* apresentam potencial antiviral significativo, tendo em vista que apresentaram valores de  $CE_{50}$  entre 4,72 e 6,35  $\mu\text{g/mL}$ , com IS superiores a 3. Cabe destacar que não foram encontrados relatos na literatura sobre a avaliação da atividade antiviral de extrato de *T. phaeocarpa* e suas respectivas frações frente ao MHV-3.

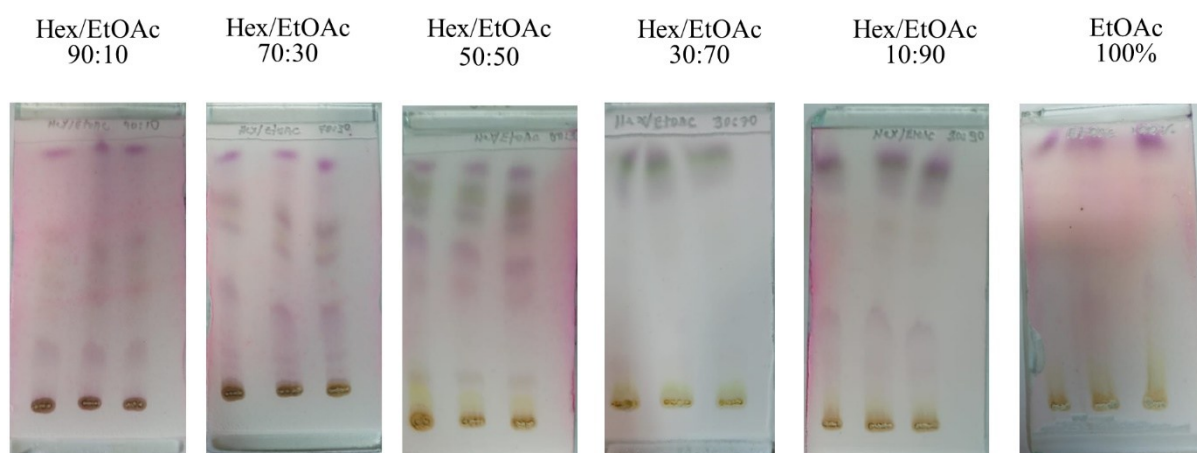




**Figura 25:** Curvas de concentração-resposta empregadas para o cálculo da concentração citotóxica para 50% das células não infectadas (CC<sub>50</sub>) e da concentração efetiva para 50% das células infectadas com vírus MHV-3 (CE<sub>50</sub>) na linhagem celular L929. A: extrato de *T. phaeocarpa*, B: fração *n*-hexânica, C: fração diclorometânica, D: fração em acetato de etila, E: fração hidrometanólica.

## 5.6 Estudo fitoquímico de *T. phaeocarpa*

Na triagem realizada (item 4.7), o extrato a etanólico de folhas de *T. phaeocarpa* apresentou maior atividade biológica frente ao vírus MHV-3 em células L929, sendo selecionado para estudo fitoquímico. Primeiramente, o perfil químico do extrato foi analisado por CCD de sílica gel (**Figura 26**). As análises por CCD de sílica gel tem como objetivo a caracterização preliminar dos extratos pela determinação do perfil cromatográfico qualitativo, observando-se a cor e o fator de retenção (Rf) das manchas na placa após o uso de soluções reveladoras, possibilitando sugerir as classes de compostos presentes nos extratos analisados (RODRIGUES et al., 2009). Nas análises realizadas, foram empregados como eluentes misturas de *n*-hexano e acetato de etila, empregando-se anisaldeído sulfúrico como revelador. Nessas condições, observou-se a presença de manchas amarelas, azuis, lilás e rosa, sugerindo a presença de compostos fenólicos e terpenóides, entre outros (**Figura 26**).

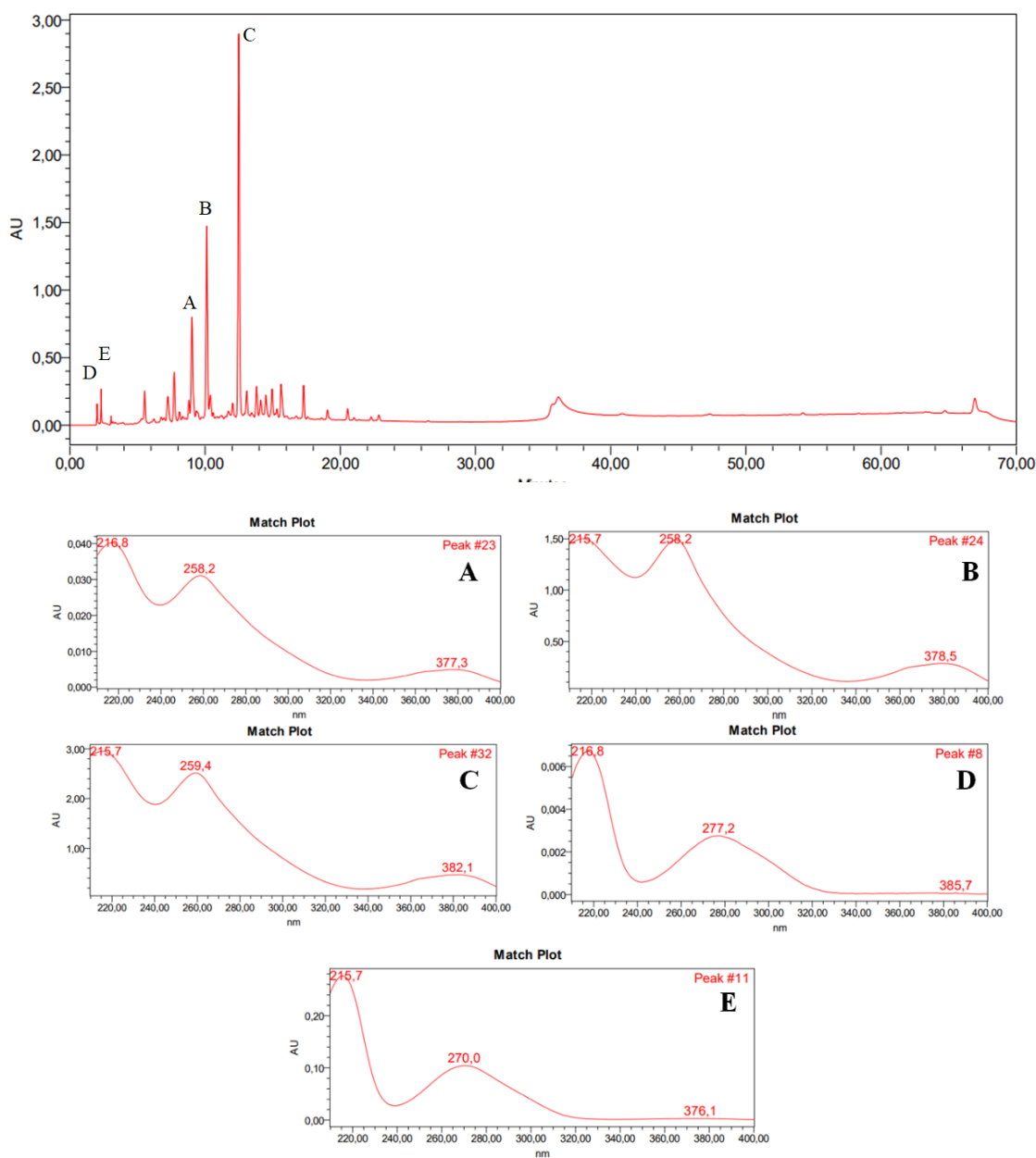


**Figura 26:** Perfis químicos do extrato de *T. phaeocarpa* obtidas em CCD de sílica gel empregando diferentes condições de eluição com *n*-hexano e EtOAc e reveladas com anisaldeído sulfúrico.

### 5.6.1 Caracterização cromatográfica do extrato de *T. phaeocarpa* por HPLC-PDA e UPLC-PDA-ESI-MS/MS

A análise da composição química do extrato etanólico de folhas de *T. phaeocarpa* foi inicialmente realizada por HPLC-PDA, empregando-se coluna de fase reversa (C18) e eluição com gradiente exploratório de ACN grau HPLC e água grau 1. O cromatograma registrado em 210 nm está representado na **Figura 27**.

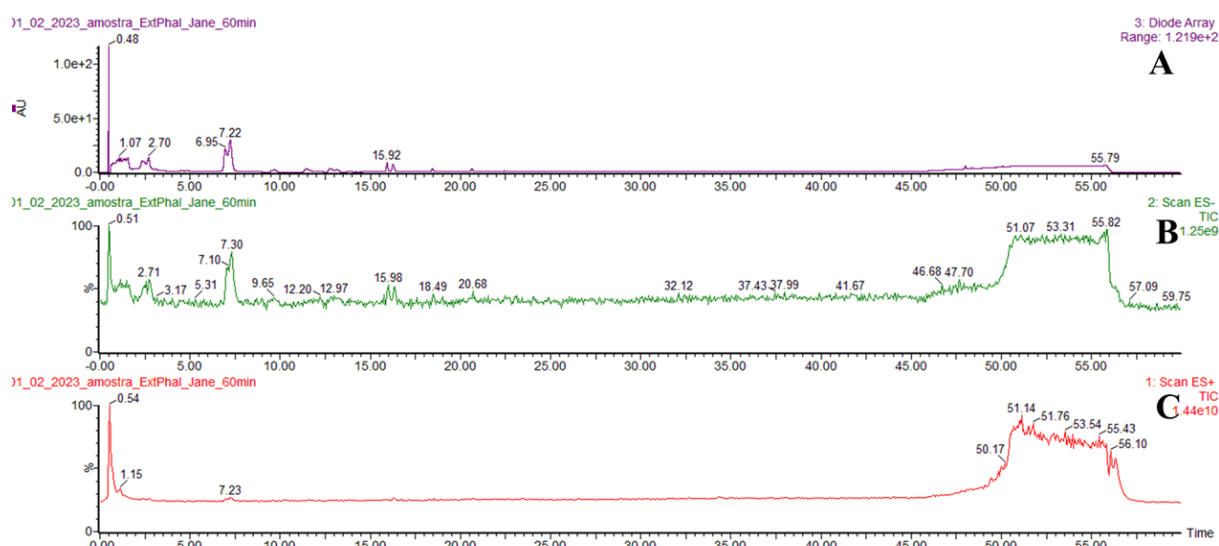
O cromatograma disposto na **Figura 27** indica que a maioria dos compostos eluiu com tempo de retenção (TR) inferior a 25 min, sugerindo o predomínio de compostos polares no extrato. Além disso, os espectros no UV confirmam a presença de compostos fenólicos, sugerido anteriormente na análise por CCD, como flavonoides e taninos. Flavonoides absorvem no UV no intervalo entre 240-450 nm, com dois máximos característicos, correspondentes às bandas I e II. A substância eluída no pico **A** com TR 9,74 min apresenta máximo de absorção em 258,2 nm correspondente a banda II, relativa do cromóforo benzoíla, e em 377,8 nm, correspondente a banda I, relativa ao cromóforo cinamoíla. De maneira semelhante, os constituintes correspondentes aos picos **B** e **C** com TR em 10,12 min e TR 12,49 min, respectivamente, com máximos de absorção de 258,2 e 378,5 nm como também, 259,4 e 382,1 nm, apresentam máximos de absorção compatíveis com flavonóis (NASEEM, et al., 2010). Já os taninos apresentam máximos de absorção no UV entre 270-290 nm. As substâncias eluídas nos picos **D** e **E** com TR 4,47 min e 5,52 min, respectivamente, apresentam máximo de absorção característicos de taninos hidrolisáveis (respectivamente em 216,8 e 277,2 nm, e em 215,7 e 270 nm (GRASEL et al., 2016; COMANDINI et al., 2014).



**Figura 27:** Cromatograma obtido por HPLC-PDA para o extrato etanólico de folhas de *T. phaeocarpa* adquirido nos comprimentos de onda de 210 nm. Os espectros no UV registrados para os picos com  $t_r = 9,74$  min (a), 10,12 min (b) e 12,49 min (c) apresentam máximos de absorção compatíveis com flavonoides, enquanto aqueles em (d) 2,31 min, (e) 3,04 min, apresentam máximos a de absorção compatíveis com taninos. Condições cromatográficas: vide item 4.22.2.

Posteriormente, o extrato de *T. phaeocarpa* foi submetido a análise por UPLC-PDA-ESI-MS/MS (**Figura 28**). Análise do extrato realizada em 60 minutos, revelando um perfil cromatográfico complexo, caracterizado por compostos de diferentes polaridades. No modo

ESI<sup>+</sup>, os principais picos foram observados em 0,54–7,23 min e na região final entre 50,17–56,10 min, sugerindo a presença de metabólitos apolares, como triterpenos e esteróis, que tendem a eluir tardiamente (MORENO-GONZÁLEZ et al., 2020). O modo ESI<sup>-</sup> exibiu picos iniciais com tempos de retenção em 0,51–7,30 min, compatíveis com compostos fenólicos e taninos hidrolisáveis, além de sinais expressivos entre 50–56 min, indicando a presença de substâncias menos polares de maior massa molecular (NACZK; SHAHIDI, 2004). O detector de arranjo de diodos (DAD) mostrou bandas de absorção intensas nos primeiros minutos (0,54–7,23 min) e em 55,79 min (dados no apêndice B e C), reforçando a coexistência de flavonoides glicosilados e triterpenos (MATEOS et al., 2018; AKHTAR et al., 2025). Os sinais observados sugerem a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos hidrolisáveis **Tabela 13**, em consonância com os resultados obtidos por CCD e HPLC-PDA.



90

**Figura 28:** Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos (a) no UV, (b) no modo de ionização negativo (ESI<sup>-</sup>) e (c) no modo de ionização positivo (ESI<sup>+</sup>). Condições cromatográficas: vide item 4.22.3

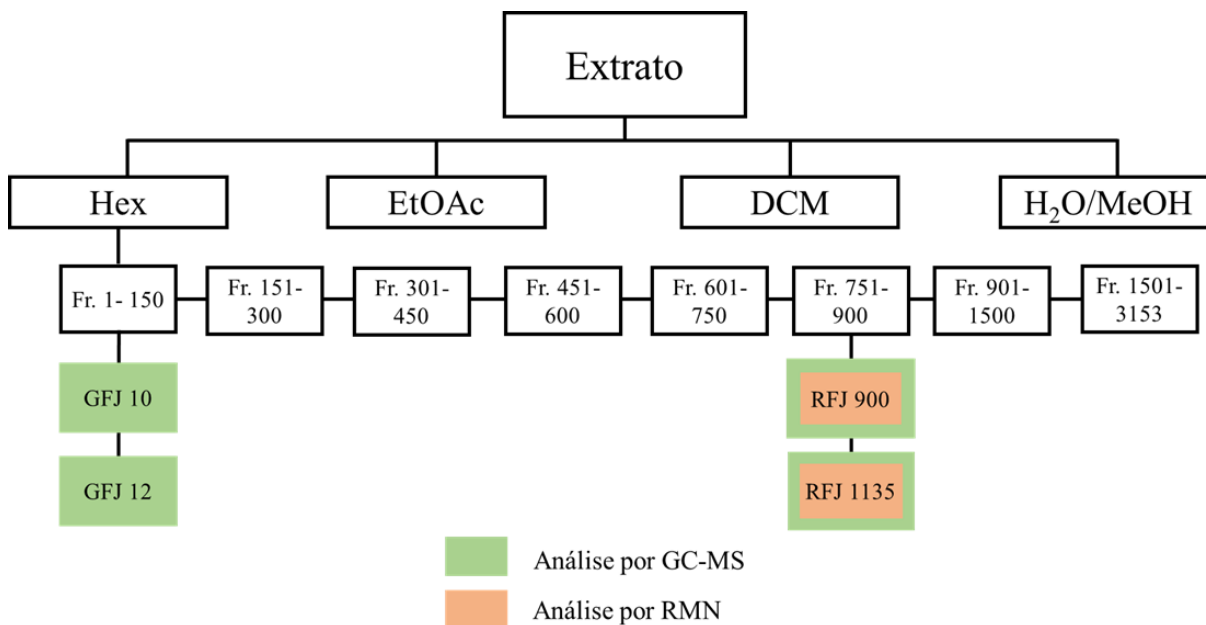
**Tabela 13: Identificação de classes de produtos naturais com base nos  $\lambda_{\max}$  observados**

<b>Código</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Máximos de absorção (nm)</b>	<b>Identificação</b>
A	0,48	259 e 377	Flavonoide (provável flavonol)
B	1,07	258 e 377	Flavonoide (flavonol/flavona)
C	2,70	258 e 378	Flavonoide (flavonol)
D	6,95	259 e 382	Flavonol (alta conjugação)
E	7,22	259 e 382	Flavonol (isômero provável do Rt 6,95)
F	15,92	256 e 378	Flavonol/possível biflavonoide
G	16,42	255 e 348	Flavona ou flavonoide pouco conjugado
H	48,01	223 e 227	Composto pouco conjugado (fenólicos simples)
I	55,79	224	Terpenos/diterpenos/triterpenos

### 5.6.2. Refracionamento da fração hexânica de *T. phaeocarpa*

As frações oriundas do extrato de *T. phaeocarpa*, obtidas por partição entre solventes imiscíveis (item 4.10), foram analisadas por HPLC-PDA. Tendo em vista a concentração da atividade biológica nas frações apolares, essas foram priorizadas nos estudos de desreplicação apresentados na sequência. Os cromatogramas registrados por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para as frações *n*-hexânica (**A**) e diclorometânica (**B**), não apresentaram picos, devido à baixa ionização dos constituintes nas condições de análise (dados não apresentados).

Procedeu-se com o refracionamento da fração *n*-hexânica em coluna de sílica gel *flash* (item 4.22.4), devido sua significativa atividade antiviral *in vitro* frente ao MHV-3, conforme apresentado no fluxograma na **Figura 29**. O refracionamento da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* resultou em 3153 frações com rendimento total de 75%. Desse total, duas amostras eluídas com Hex/EtOAc (98:2) foram analisadas por GC-MS, tendo em vista seu aspecto graxo, e dois sólidos eluídos com Hex/EtOAc (85:15 e 70:30) foram analisadas por RMN (**Figura 29**).



**Figura 29:** Fluxograma de fracionamento do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* e refração da fração *n*-hexânica, indicando as subfrações analisadas por GC-MS e RMN.

### 5.7 Identificação estrutural de constituintes de *T. phaeocarpa* por GC-MS

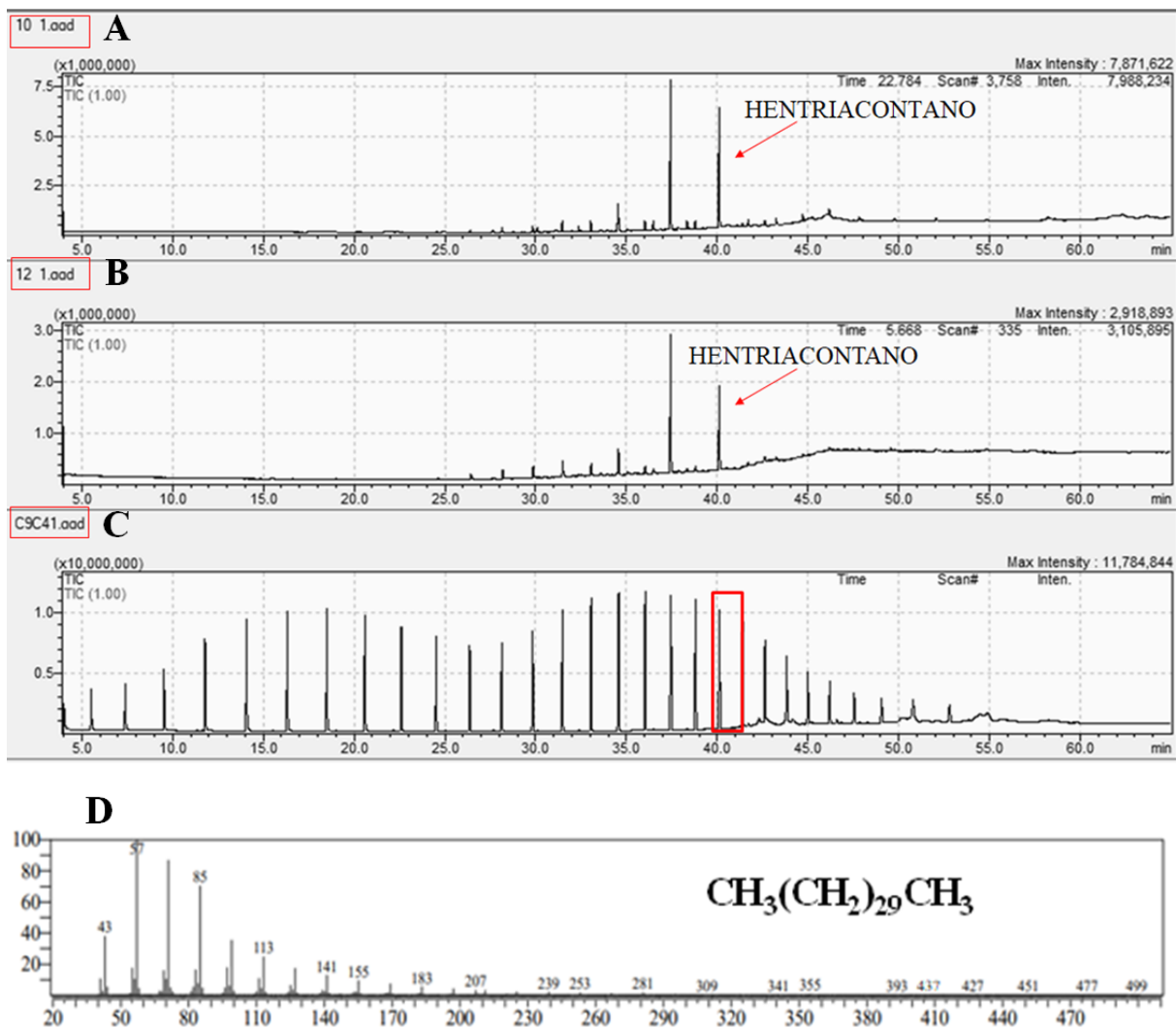
Por apresentarem aspecto graxo as frações GFJ10 e GFJ12, oriundas do refração da Fr. Hex de *T. phaeocarpa* (**Tabela 14**), foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS). As frações GFJ10 e GFJ12 apresentaram mais de uma substância em sua composição, indicando tratar-se de misturas. Já as frações RFJ900 e RFJ1135 apresentaram um único pico quando analisadas por GC-MS, sendo, portanto, substâncias isoladas. A identificação dos constituintes nessas frações baseou-se na comparação dos tempos de retenção, índices de retenção e nos espectros de massas obtidos e comparação com dados disponíveis na biblioteca NIST08. Considerou-se um mínimo de 85% de similaridade para as identificações realizadas.

A análise da composição química das frações possibilitou identificar 7 compostos, sendo todos hidrocarbonetos, um triterpeno e um fitoesterol (**Tabela 14**). As estruturas químicas das substâncias identificadas estão dispostas na **Figura 31**. Os procedimentos realizados para identificação dos constituintes serão descritos utilizando como exemplo uma das substâncias identificadas.

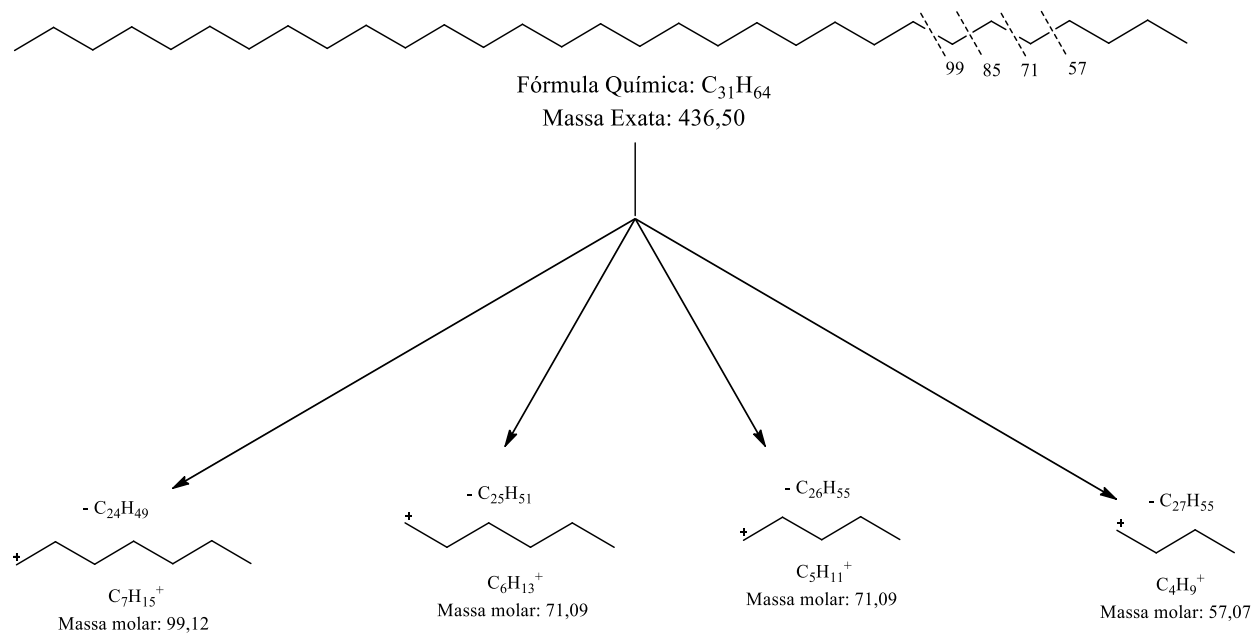
### 5.7.1 Hentriacontano

Os cromatogramas de íons totais obtidos por GC-MS para as amostras GFJ10 (A) e CFJ12 (B) apresentaram picos com tempos de retenção em 40,105 e 40,110 minutos, respectivamente (Figura 30), correspondente ao hentriacontano. O espectro de massas registrado para este constituinte (D) apresentou os íons fragmentos em  $m/z$  99  $[M-C_{24}H_{49}]^+$  (40%);  $m/z$  71  $[M-C_{26}H_{52}]^+$  (90%);  $m/z$  57  $[C_4H_9]^+$  (100%), que são fragmentações comumente identificadas em hidrocarbonetos lineares (Figura 31). Para identificação dos compostos presentes nas amostras, o espectro de massas obtido foi comparado com espectros de massas de compostos conhecidos fornecidos pela biblioteca NIST08. Em seguida, foram calculados os índices de retenção das amostras, com a finalidade de auxiliar na confirmação da identidade do composto detectado. Esses valores foram comparados com os índices de retenção de compostos de referência disponíveis na literatura e na biblioteca NIST08. O índice de retenção obtido experimentalmente para a amostra foi de 3098, valor bastante próximo ao registrado na biblioteca (3100), o que reforça a correspondência entre o composto analisado e o hentriacontano. Adicionalmente, a comparação entre os cromatogramas das amostras e o cromatograma do padrão sintético da série de hidrocarbonetos lineares  $C_9-C_{40}$  (Figura 30C) mostrou que os picos apresentam tempos de retenção semelhantes (Figuras 30A, B e C), corroborando a identificação proposta.

Além da comparação do tempo de retenção e do índice de retenção, para a identificação dos constituintes levou-se em consideração uma similaridade acima de 85% entre o espectro de massas do composto desconhecido e o espectro de massas de compostos de referência. No caso das amostras GFJ10 e GFJ12 obteve-se uma similaridade de 87% para o hentriacontano, sugerindo tratar-se do hidrocarboneto linear de fórmula molecular  $C_{31}H_{64}$  e massa molar 436,8 g/mol. Até o momento, não há registro da ocorrência de hentriacontano em *T. phaeocarpa*; no entanto, sua ocorrência foi relatada em *Terminalia arjuna* (HAQUE ET AL., 1970).

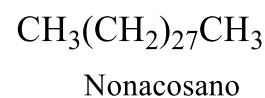
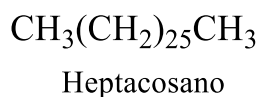
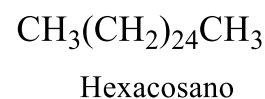
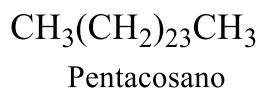
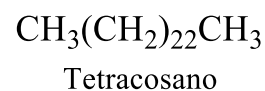
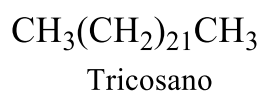


**Figura 30:** Perfis cromatográficos obtidos por GC-MS para as amostras GFJ10 (A) e GFJ12 (B) e para mistura de padrões de hidrocarbonetos lineares da série C<sub>9</sub>C<sub>40</sub> (C); espectro de massas (D) registrado para o hentriacontano, substância com TR = 40,105 e 40,110 nos cromatogramas em A, B e C.



**Figura 31:** Fragmentação para a substância hentriacontano registrado para as amostras GFJ10 e GFJ12 de Fr. Hex de *T. phaeocarpa*.

Na **tabela 14** estão descritos os constituintes identificados nas amostras analisadas. A ocorrência dos demais constituintes identificados, a saber, heptacosano, nonacosano, tricosano, tetracosano, pentacosano e hexacosano, é inédita na espécie e no gênero *Terminalia* (**Figura 32**).



**Figura 32:** Estruturas químicas de constituintes identificados em frações derivadas da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* por GC-MS.

**Tabela 14:** Composição química dos grupos de frações reunidas GFJ10, GFJ12, RFJ811 e RFJ1134 de *T. phaeocarpa*, identificada por GC-MS.

Amostra	Pico	TR (min)	Substância	FM	Area (%)	IR Nist	IR calc.	MM (gmol <sup>-1</sup> )	Fragmento <i>m/z</i> atribuição (intesindade)
GFJ10	1	34,550	Heptacosano	C <sub>27</sub> H <sub>26</sub>	7,23	2705	2698	380	113[M- C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> ] <sup>+</sup> (20%); 99 [M- C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> ] <sup>+</sup> (30%); 85[M- C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> ] <sup>+</sup> (55%); 57 [M- C <sub>23</sub> H <sub>47</sub> ] <sup>+</sup> (100%).
	2	37,425	Nonacosano	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	34,70	2904	2898	408	127 [M- C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> ] <sup>+</sup> (20%); 113 [M- C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> ] <sup>+</sup> (30%); 99 [M- C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> ] <sup>+</sup> (40%); 57 [M- C <sub>25</sub> H <sub>51</sub> ] <sup>+</sup> (100%).
	3	40,105	Hentriacontano	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	29,05	3100	3098	436,8	99 [M- C <sub>24</sub> H <sub>49</sub> ] <sup>+</sup> (40%); 71 [M- C <sub>26</sub> H <sub>53</sub> ] <sup>+</sup> (90%); 57 [M- C <sub>27</sub> H <sub>55</sub> ] <sup>+</sup> (100%).
GFJ12	1	28,180	Tricosano	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	3,10	2300	2303	324,6	71 [M- C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> ] <sup>+</sup> (10%); 57 [M- C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> ] <sup>+</sup> (90%); 44 [M- C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> ] <sup>+</sup> (100%).
	2	29,865	Tetracosano	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	3,91	2407	2402	338	85 [M- C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> ] <sup>+</sup> (55%); 71 [M- C <sub>19</sub> H <sub>39</sub> ] <sup>+</sup> (82%); 57 [M- C <sub>20</sub> H <sub>41</sub> ] <sup>+</sup> (100%).

	3	31,490	Pentacosano	$C_{25}H_{52}$	4,92	2500	2501	352,7	85 [M- $C_{19}H_{39}$ ] <sup>+</sup> (55%); 71 [M- $C_{20}H_{41}$ ] <sup>+</sup> (82%); 57 [M- $C_{21}H_{43}$ ] <sup>+</sup> (100%). 99 [M- $C_{19}H_{39}$ ] <sup>+</sup> (30%);
	4	33,060	Hexacosano	$C_{26}H_{54}$	4,00	2600	2600	366,7	85 [M- $C_{20}H_{41}$ ] <sup>+</sup> (55%); 57 [M- $C_{22}H_{45}$ ] <sup>+</sup> (100%). 113[M- $C_{19}H_{39}$ ] <sup>+</sup> (20%); 99 [M- $C_{20}H_{41}$ ] <sup>+</sup> (30%);
	5	34,565	Heptacosano	$C_{27}H_{56}$	7,64	2700	2699	380	85[M- $C_{21}H_{43}$ ] <sup>+</sup> (55%); 57 [M- $C_{23}H_{47}$ ] <sup>+</sup> (100%). 127 [M- $C_{20}H_{41}$ ] <sup>+</sup> (20%); 113 [M- $C_{21}H_{43}$ ] <sup>+</sup> (30%);
	6	37,425	Nonacosano	$C_{29}H_{60}$	43,56	2900	2898	408	99 [M- $C_{22}H_{45}$ ] <sup>+</sup> (40%); 57 [M- $C_{25}H_{51}$ ] <sup>+</sup> (100%). 99 [M- $C_{24}H_{49}$ ] <sup>+</sup> (40%);
	7	40,110	Hentriacontano	$C_{31}H_{64}$	27,37	3100	3099	436,8	71 [M- $C_{26}H_{52}$ ] <sup>+</sup> (90%); 57 [M- $C_{27}H_{55}$ ] <sup>+</sup> (100%). 426 [M] <sup>+•</sup> (traços);
RFJ 900	1	44,105	$\beta$ -amirina	$C_{30}H_{50}O$	100	3424	3327	426,7	218 [ $C_{15}H_{22}O$ ] <sup>+</sup> (40%); 203 [ $C_{14}H_{19}O$ ] <sup>+</sup> (60%); 189 [ $C_{13}H_{17}O$ ] <sup>+</sup> (30%);

RFJ 1135	1	43,515	$\beta$ -sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	100	3220	3373	414	43 $[C_3H_7]^+$ (100%). 414 $[M]^+$ • (traços); 329 $[M - C_6H_{13}]^+$ (20%); 207 $[C_{15}H_{27}]^+$ (40%); 145 $[C_{11}H_{13}]^+$ (60%); 107 $[C_8H_{11}]^+$ (80%); 81 $[C_6H_9]^+$ (70%); 43 $[C_3H_7]^+$ (100%).
-------------	---	--------	---------------------	-----------------	-----	------	------	-----	---

**Legenda:** TR = Tempo de retenção; FM = Fórmula molecular; IR Nist= Índice de retenção biblioteca Nist; IR cal= Índice de retenção calculado; MM = Massa molecular.

## 5.8 Identificação estrutural dos sólidos isolados de *T. phaeocarpa*

### 5.8.1 Isolamento e elucidação estrutural de RFJ900

Para a identificação dos compostos isolados a partir do refração da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* em coluna cromatográfica de sílica gel *flash*, foram obtidos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , procedendo-se a comparação com os dados descritos na literatura.

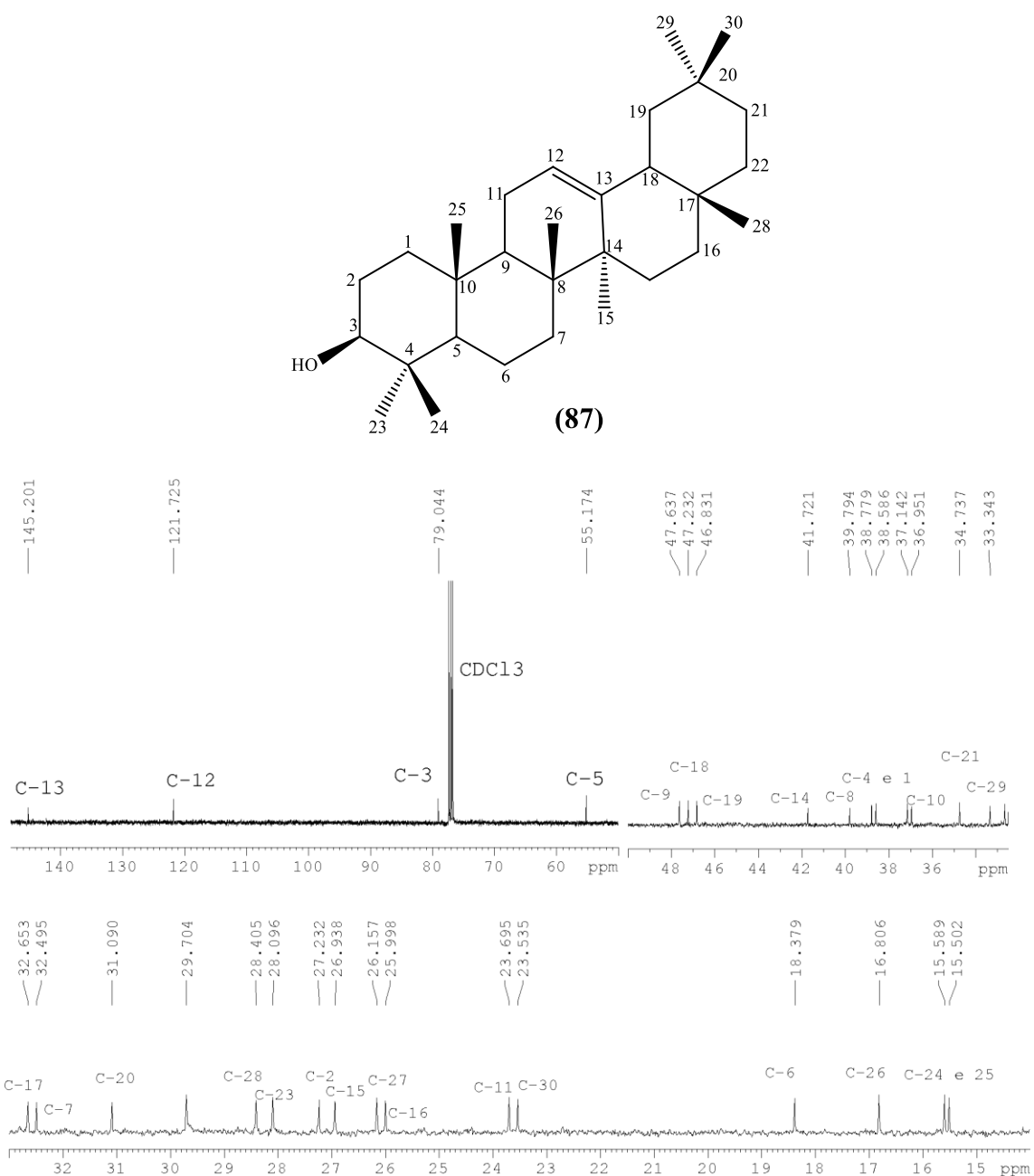
A amostra RFJ900 foi obtida como um sólido branco, eluída com Hex/EtOAc (85:15). Análise da amostra por CCD de sílica gel e revelação com anisaldeído sulfúrico apresentou mancha única de coloração rosa, sugerindo tratar-se de um terpeno.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para RFJ900 (**Figuras 33**) apresentou 30 sinais de ressonância, sugerindo tratar-se de um triterpeno. A distinção entre os diferentes tipos de carbonos foi realizada pelo experimento DEPT-135 (**Figura 34**), que indicou a presença de 8 carbonos metílicos, 10 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos, e 7 carbonos não hidrogenados sugerindo um esqueleto pentacíclico (DIAS, et al., 2011). A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  possibilitou, ainda, identificar sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  121,70 ppm e 145,20 ppm, atribuído a carbono quartenário, bem como sinal em 79,04 ppm característico de carbono carbinólico (**Figura 33**). A comparação dos dados de ressonância de RFJ900 com dados relatados na literatura para triterpenos (VIET et al., 2021) indicou tratar-se da  $\beta$ -amirina. Os demais sinais foram atribuídos por comparação com dados relatados na literatura e estão dispostos na **Tabela 15**.

Por sua vez, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 35**) observou-se um tripleto centrado em  $\delta$  5,18 ppm ( $J = 3,6$  MHz) característico de hidrogênio olefínico. Também observou-se um duplete duplo em 3,23 ppm (dd,  $J = 11,3$  e 4,4 MHz), atribuído ao hidrogênio metínico H-3. Identificaram-se, também, sete simpletos em 0,79, 0,83, 0,87, 0,94, 0,97, 1,00 e 1,13 ppm correspondentes a oito grupos metila, sendo que a integral do sinal em  $\delta$  0,87 indicou tratar-se de seis hidrogênios (**Tabela 16**). Os dados espectrais obtidos e a comparação com dados relatados na literatura possibilitaram confirmar a identidade de RFJ900 como sendo o triterpeno  $\beta$ -amirina.

Os isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina podem ser identificados pela posição dos sinais no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Assim, a  $\alpha$ -amirina apresenta sinais em 139,60 ppm e 124,40 ppm para os

carbonos olefinicos, enquanto a  $\beta$ -amirina apresenta sinal em 145,20 ppm característico de carbono  $sp^2$  não hidrogenado (C-13), e 121,70 ppm, característico de carbono  $sp^2$  hidrogenado (C-12). (VIET, et al., 2021). Pelo exposto, os dados espectrais obtidos para RFJ900, descritos anteriormente, indicam tratar-se da  $\beta$ -amirina (**87**). Adicionalmente, os valores da constante de acoplamento escalar ( $J=11,38$  e  $4,48$  Hz) de H-3 indicam que a hidroxila ocupa a posição beta em C-3 (**Tabela 15**). O valor de  $J$  de 11,38 Hz é resultante de um acoplamento *trans*-diaxial de H-3 com H-2<sub>ax</sub>, enquanto a constante de acoplamento de 4,48 Hz é originária do acoplamento axial-equatorial de H-3 com H-2<sub>eq</sub>. Estes dados confirmam que RFJ900 é o isômero  $\beta$ - amirina.



**Figura 33:** Expansões do espectro de RMN de  $^{13}C$  obtido para RFJ900 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).

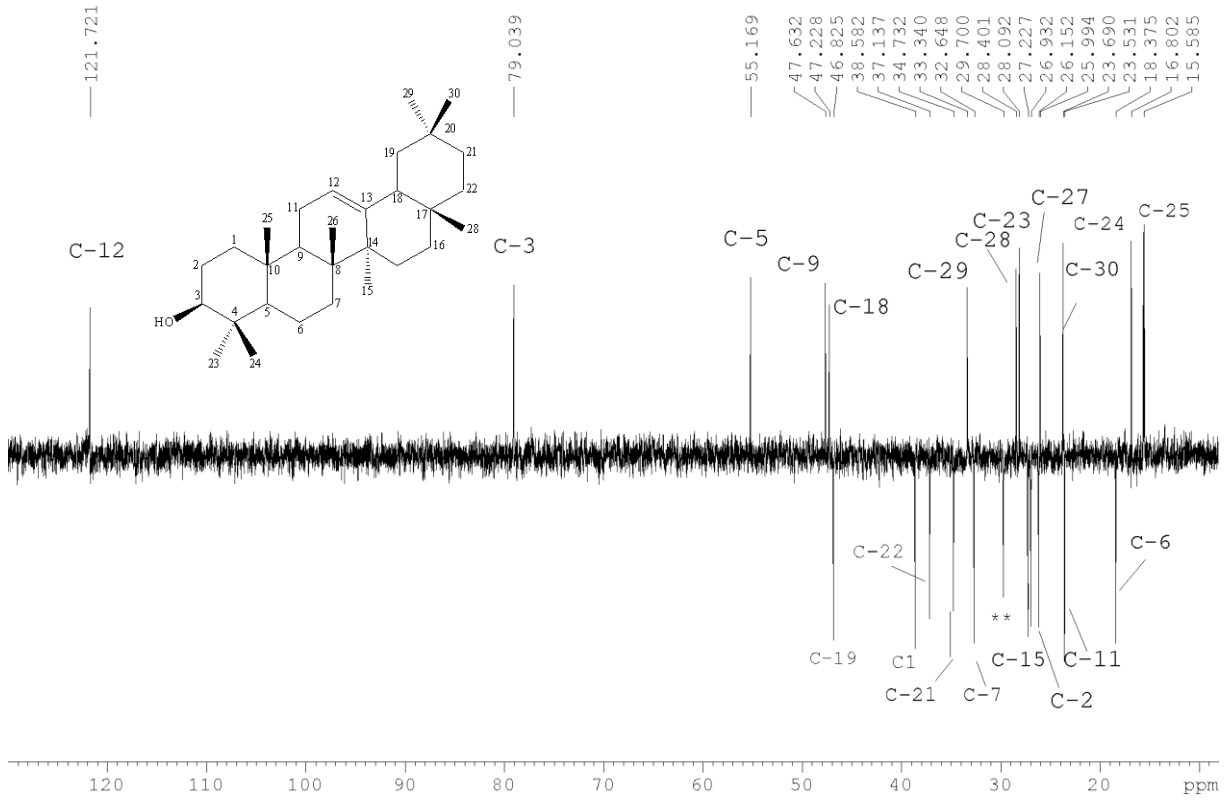


Figura 34: Subespectro DEPT-135 obtido para RFJ900 (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).

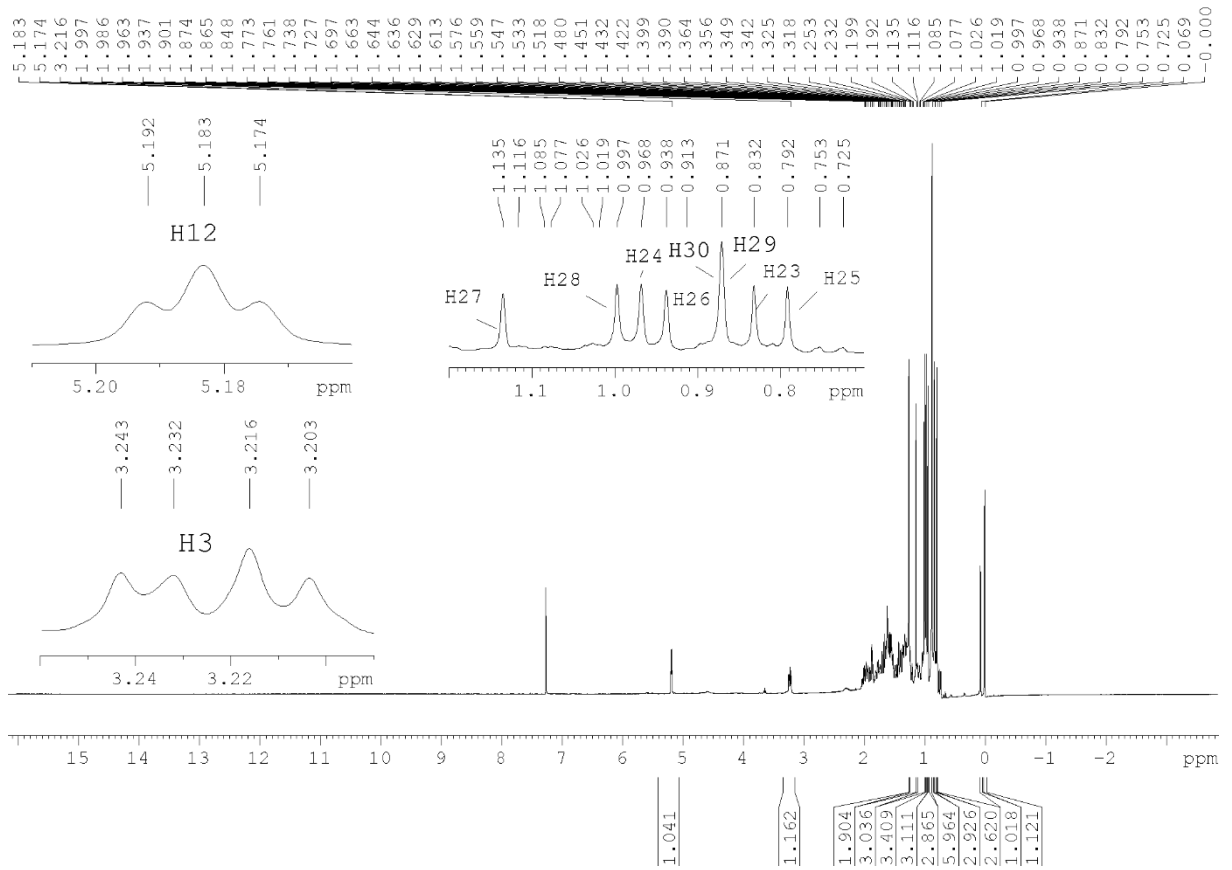


Figura 35: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H obtido para RFJ900 e expansões (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

**Tabela 15:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para RFJ900 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e dados da literatura relatados para  $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ , <sup>a,c</sup>500 e <sup>b</sup>600 MHz).

<b>H</b>	<b>RFJ900</b> $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<b><sup>a</sup> Florentino Neto (2018)</b> $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<b><sup>b</sup>Pereira (2022)</b> $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<b><sup>c</sup>Okoye et al., (2014)</b> $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)
<b>3</b>	3,23 (dd, <i>J</i> 11,3 e 4,4Hz)	3,22 (dd, <i>J</i> 11,1 e 4,4 Hz)	3,18 (dd, <i>J</i> 11,64 e 4,8 Hz)	3,20 (dd, <i>J</i> 11,5 e 4,4 Hz)
<b>5</b>	0,73 (d, <i>J</i> 11,28 Hz)	0,73 (d, <i>J</i> 12,0 Hz)	0,75 (m)	0,71
<b>12</b>	5,18 (t, <i>J</i> 3,6 Hz)	5,12 (t, <i>J</i> 3,6 Hz)	5,18 (t, <i>J</i> 3,4 Hz)	5,16 (t, <i>J</i> 3,5 Hz)
<b>15</b>	1,89 (m)	1,99 (m)	1,89 (m)	-
<b>16</b>	1,73 (m)	1,99 (m)	1,74 (m)	-
<b>19</b>	1,99 (dd, <i>J</i> 13,5 e 4,4 Hz)	-	1,98 (dd, <i>J</i> 13,2 e 4,5 Hz)	1,59
<b>22</b>	1,86 (m)	1,91 (dt, <i>J</i> 7,2 e 3,0 Hz)	1,85 (m)	-
<b>23</b>	0,83 (s)	0,99 (s)	0,80 (s)	0,77 (s)
<b>24</b>	0,96 (s)	0,80 (s)	1,00 (s)	0,98 (s)
<b>25</b>	0,79 (s)	0,79 (s)	0,95 (s)	0,92 (s)
<b>26</b>	0,93 (s)	0,95 (s)	0,99 (s)	0,94 (s)
<b>27</b>	1,13 (s)	1,07 (s)	1,13 (s)	1,11 (s)
<b>28</b>	0,99 (s)	0,99 (s)	1,00 (s)	0,81 (s)
<b>29</b>	0,87 (s)	0,91 (d, <i>J</i> 5,7 Hz)	0,87 (nd)	0,85 (s)
<b>30</b>	0,87 (s)	0,79 (m)	0,80 (nd)	0,85 (s)

Legenda: multipeto (m); não identificado (nd).

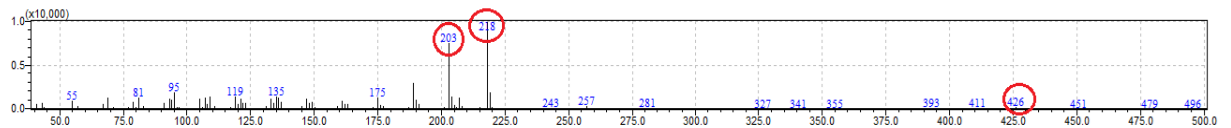
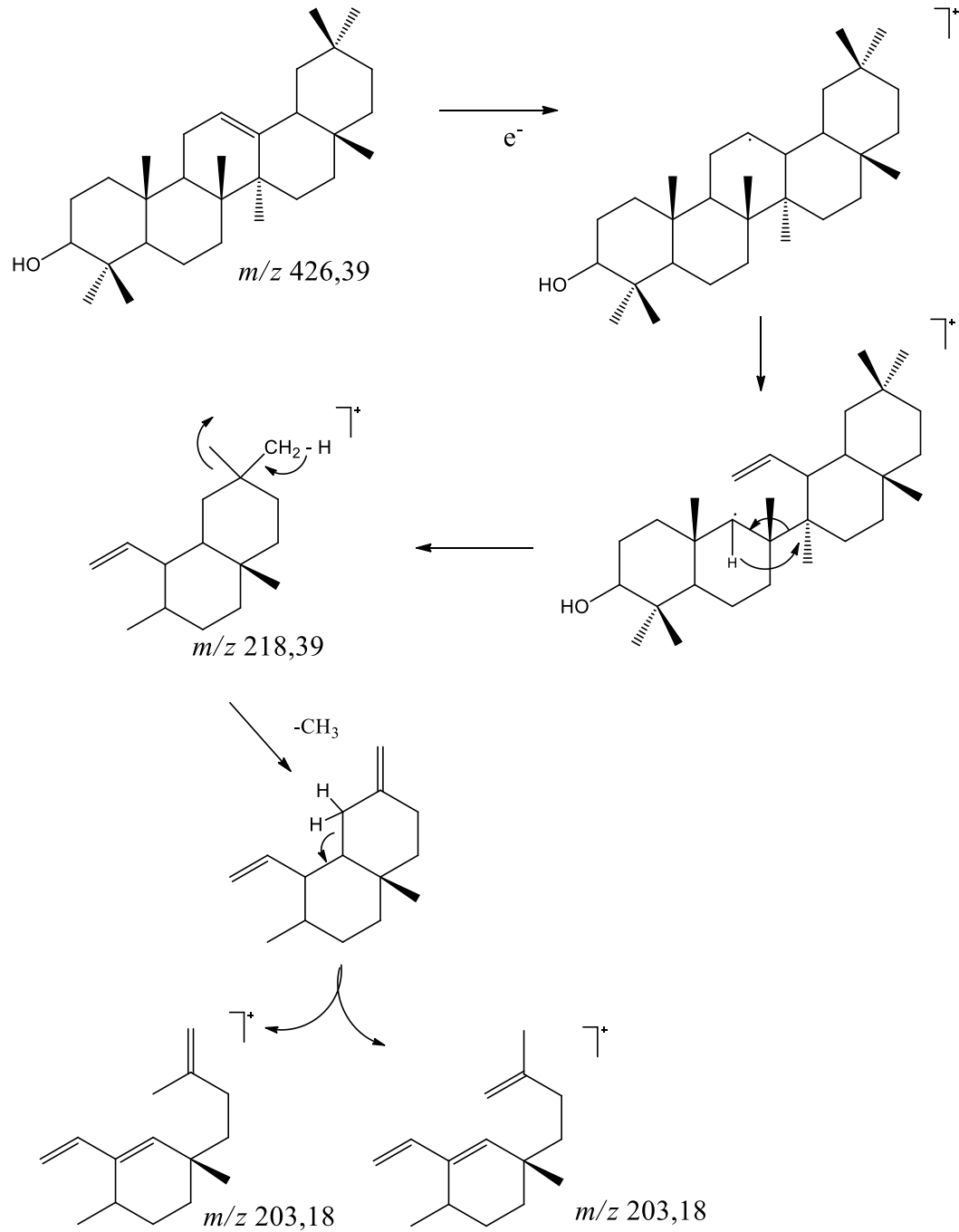
**Tabela 16:** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  de RFJ900 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) e comparação com dados da literatura para  $\beta$ -amirina ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^{a}125$  e  $^{b}150$  MHz).

Carbono	RFJ900 $\delta$ (ppm)	<sup>a</sup> Viet et al., (2021) $\delta$ (ppm)	<sup>b</sup> Pereira (2022) $\delta$ (ppm)	Tipo de carbono
1	38,5	38,6	39,0	CH <sub>2</sub>
2	26,1	27,2	27,5	CH <sub>2</sub>
3	79,0	79,2	79,3	CH
4	39,7	39,8	37,1	C
5	55,1	55,2	55,4	CH
6	18,3	18,4	18,6	CH <sub>2</sub>
7	32,6	32,5	32,9	CH <sub>2</sub>
8	41,7	41,7	40,2	C
9	47,6	47,6	47,8	CH
10	37,0	37,0	37,1	C
11	23,4	23,7	23,6	CH <sub>2</sub>
12	121,7	121,7	121,9	CH
13	145,2	145,2	145,4	C
14	41,7	42,8	42,3	C
15	27,2	26,9	27,5	CH <sub>2</sub>
16	26,7	26,9	27,1	CH <sub>2</sub>
17	32,6	32,7	32,7	C
18	47,2	47,2	47,4	CH <sub>2</sub>
19	46,8	46,8	47,0	CH <sub>2</sub>
20	31,0	31,1	33,5	C
21	34,7	34,7	34,9	CH <sub>2</sub>
22	37,1	37,1	37,3	CH <sub>2</sub>
23	28,1	28,1	28,3	CH <sub>3</sub>
24	15,5	15,6	15,8	CH <sub>3</sub>
25	15,5	15,5	15,9	CH <sub>3</sub>
26	16,8	16,8	17,1	CH <sub>3</sub>
27	26,0	26,0	26,2	CH <sub>3</sub>
28	28,4	28,4	28,6	CH <sub>3</sub>

29	33,3	33,0	33,5	CH <sub>3</sub>
30	23,7	23,5	23,9	CH <sub>3</sub>

Confirmação adicional da identificação de RFJ900 como sendo  $\beta$ -amirina foi fornecida pela análise do espectro obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas com ionização por impacto eletrônico. A análise do espectro permitiu a proposta de fragmentação da  $\beta$ -amirina, representada na **Figura 36**, adaptada de Silva (2014).

A  $\beta$ -amirina é um triterpeno de ampla distribuição, comumente encontrado em diferentes plantas. Recentemente, foi isolada de folhas de *T. glabrensces* (PEREIRA, 2022). Até o momento não se tem conhecimento da ocorrência de  $\beta$ -amirina em *T. phaeocarpa*, sendo aqui relatada pela primeira vez.



**Figura 36.** Espectro de massa obtido por GC-MS e proposta de fragmentação da  $\beta$ -amirina com a formação dos fragmentos em  $m/z$  218 e  $m/z$  203  $m/z$  (RFJ900), adaptada de Silva (2014).

### 5.8.2 Isolamento e elucidação estrutural de RFJ1135

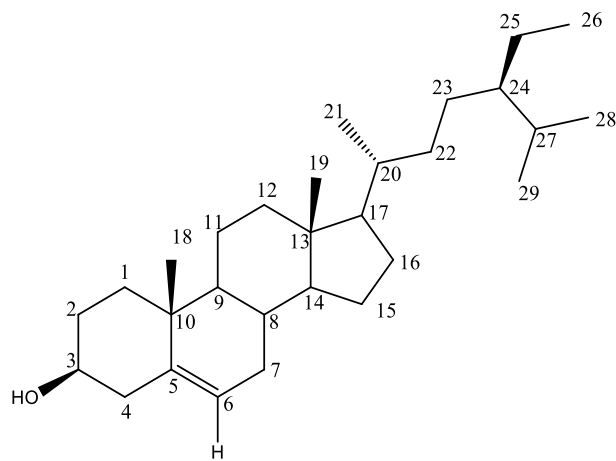
RFJ1135 foi obtido como um sólido branco resultante do agrupamento das frações eluídas com Hex/EtOAc (70:30), a partir do refractionamento da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* em coluna de sílica gel *flash*. A análise das amostras por CCD de sílica gel e revelação com anisaldeído sulfúrico apresentou mancha única de coloração rosa, sugerindo um terpeno ou esteróide.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Figura 37**) obtido para RFJ1135, apresentou 29 sinais de ressonância, compatível com uma substância da classe dos fitoesteróis. No subespectro DEPT-135 (**Figura 38**) observou-se 6 sinais correspondentes a carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), 12 carbonos metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e oito sinais de carbonos metínicos ( $\text{CH}$ ). Comparando-se os sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de RFJ1135 e o subespectro DEPT-135, conclui-se que a substância possui 3 carbonos não hidrogenados. Ainda no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observou-se sinal com deslocamento químico de 71,8 ppm, atribuído a carbono carbinólico, e sinais em 140,8 ppm e 121,7 ppm, atribuídos aos carbonos olefínicos (CHAVES et al., 2010). A comparação dos sinais de ressonância de RFJ1135 com dados da literatura (LUHATA, 2015) indicou tratar-se do  $\beta$ -sitosterol. Os demais sinais foram atribuídos por comparação com a literatura e estão dispostos na **Tabela 17**.

Por sua vez, na análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 39**) observou-se um multiplete em 3,52 ppm (m) atribuído ao hidrogênio metínico H-3, bem como sinal de hidrogênio olefínico em 5,35 ppm (d,  $J= 5,2$  Hz) atribuído a H-5. Observaram-se ainda, seis simpletos em 0,68; 0,82; 0,84; 0,87; 0,92 e 1,00 ppm correspondentes a seis grupos metila.

A comparação dos dados espectrais obtidos com dados da literatura possibilitou identificar RFJ1135 como sendo  $\beta$ -sitosterol (**88**). As atribuições dos sinais de ressonância estão dispostas nas **Tabelas 17 e 18**.

O  $\beta$ -sitosterol é um fitoesterol de ampla ocorrência na membrana plasmática das plantas, correspondendo a 65% da sua composição (SHARMA et al., 2021).



(88)

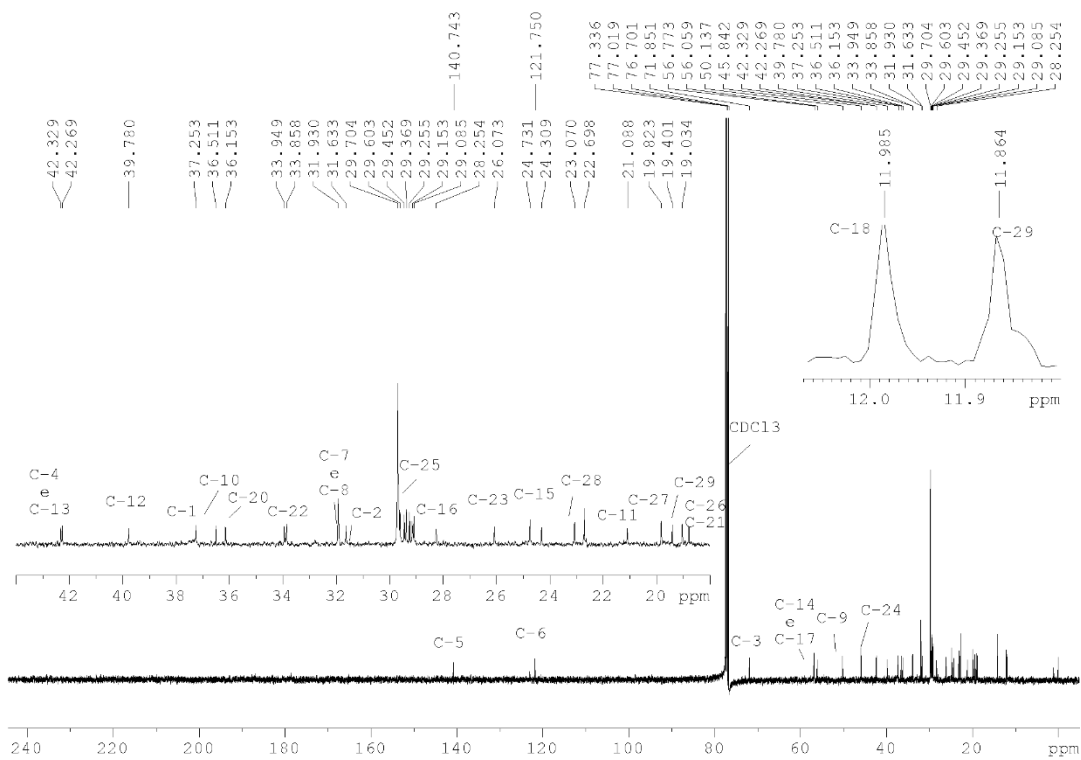
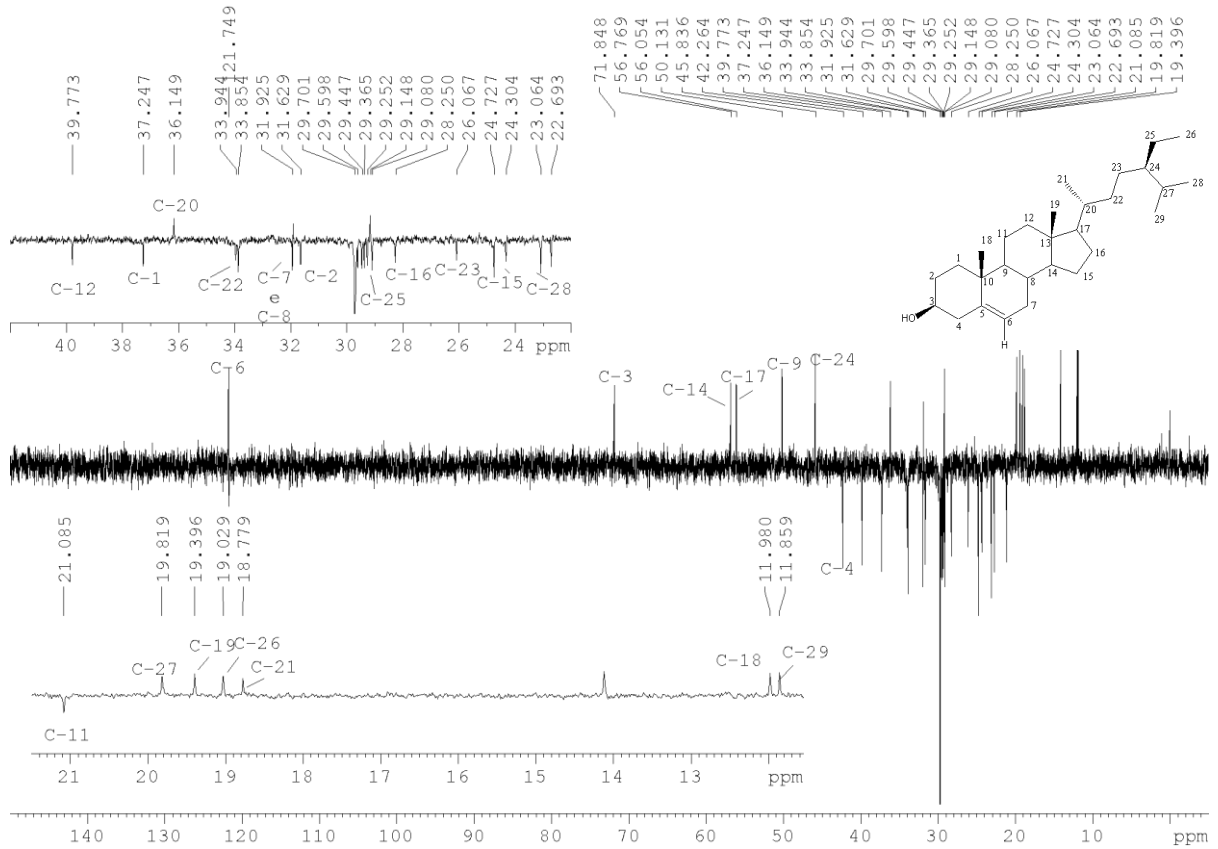


Figura 37: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para RFJ1135 e expansões ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz).



**Figura 38:** Subespectro DEPT-135 obtido para RFJ1135 e expansões (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz).

**Tabela 17:** Atribuições dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  de RFJ1135 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) e comparação com dados da literatura para o  $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^{\text{a}}150$  e  $^{\text{b}}50,3$  MHz).

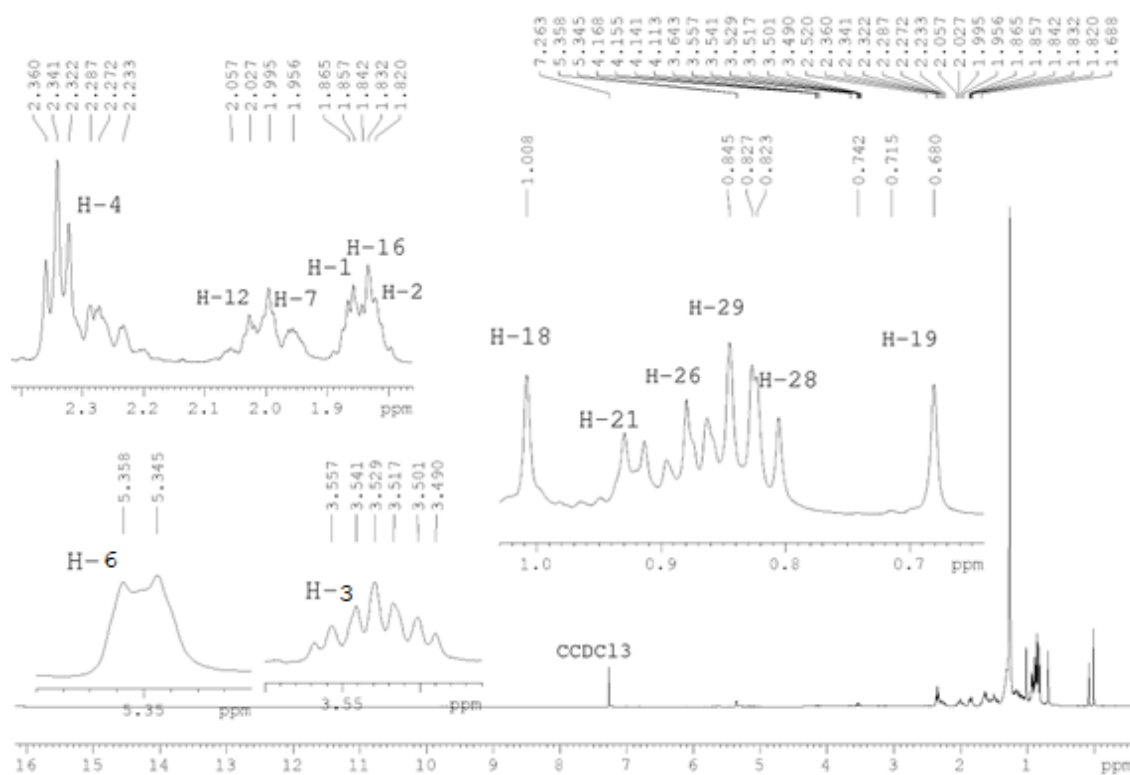
Carbono	RFJ1135 $\delta$ (ppm)	<sup>a</sup> Perreira (2022) $\delta$ (ppm)	<sup>b</sup> Goulart et al. (1993) $\delta$ (ppm)	Tipo de carbono
1	37,2	37,2	37,2	CH <sub>2</sub>
2	31,6	31,6	31,6	CH <sub>2</sub>
3	71,8	71,8	71,8	CH
4	42,2	42,3	42,2	CH <sub>2</sub>
5	140,7	140,7	140,7	C
6	121,7	121,7	121,7	CH
7	31,9	31,9	31,8	CH <sub>2</sub>
8	31,9	31,9	31,8	CH <sub>2</sub>
9	50,1	50,1	50,1	CH
10	36,5	36,5	36,4	C
11	21,0	21,1	21,0	CH <sub>2</sub>
12	39,7	39,8	39,7	CH <sub>2</sub>
13	42,2	42,3	-	C
14	56,7	56,7	56,7	CH
15	24,3	24,3	24,3	CH <sub>2</sub>
16	28,2	28,2	28,2	CH <sub>2</sub>
17	56,0	56,0	56,0	CH
18	11,9	11,9	11,8	CH <sub>3</sub>
19	19,4	19,4	19,3	CH <sub>3</sub>
20	36,1	36,1	36,1	CH
21	18,7	18,7	19,0	CH <sub>3</sub>
22	33,9	33,9	33,9	CH <sub>2</sub>
23	26,0	26,1	-	CH <sub>2</sub>
24	45,8	45,8	45,8	CH
25	29,6	23,0	26,0	CH <sub>2</sub>
26	19,0	19,0	18,7	CH <sub>3</sub>
27	19,8	19,1	19,8	CH
28	23,0	23,0	23,0	CH <sub>2</sub>
29	11,8	11,8	11,9	CH <sub>3</sub>

**Tabela 18:** Atribuição dos sinais de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de RFJ1135 e dados da literatura relatados para o  $\beta$ -sitosterol ( $\text{CDCl}_3$ ,  $^a$ 600 e  $^b,^c$ 400 MHz).

Hidrogênio	RFJ1135 $\delta$ (ppm)	$^a$ Pereira (2022) $\delta$ (ppm)	$^b$ Luhata (2015) $\delta$ (ppm)	$^c$ Okoro et al., (2018) $\delta$ (ppm)
1	1,86	1,85	-	
2	1,82	1,83	-	
3	3,52 (m)	3,52 (m)	-	3,54 (tdd, 1H)
4	2,28	2,28	-	
6	5,35 (d, $J$ 5, MHz)	5,35	5,31 (t, 1H)	5,36 (m, 1H)
7	1,99	1,98	-	
8	1,45	1,46	-	
9	0,94	0,94	-	
11	1,47	1,47	-	
12	2,05	2,00	-	
14	0,98	0,98	-	
15	1,59	1,58	-	
16	-	1,84	-	
17	1,11	1,10	-	
18	1,00	1,01	1,03 (S, 3H)	1,27 (d, 3H)
19	0,68 (s)	0,68	0,71 (S, 3H)	0,71 (d, 3H)
20	1,36	1,36	-	
21	0,91 (d, $J$ 6,48 Hz)	0,92 (d, $J$ 6,48 Hz)	0,91 (d, 3H)	1,17 (d, 3H)
22	1,30	1,32	-	-
23	1,16	1,16	-	-
24	0,93	0,93	-	
25	1,21	1,23	-	
26	0,89 (d, $J$ 6,68 Hz)	0,86 (m)	0,80 (d, 3H)	0,86 (d, 3H)

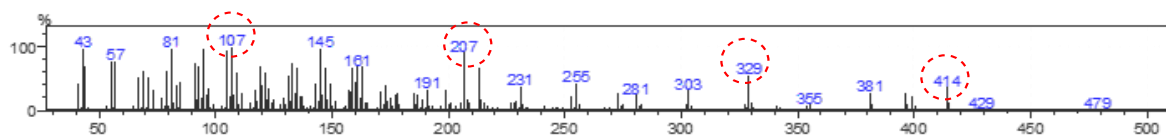
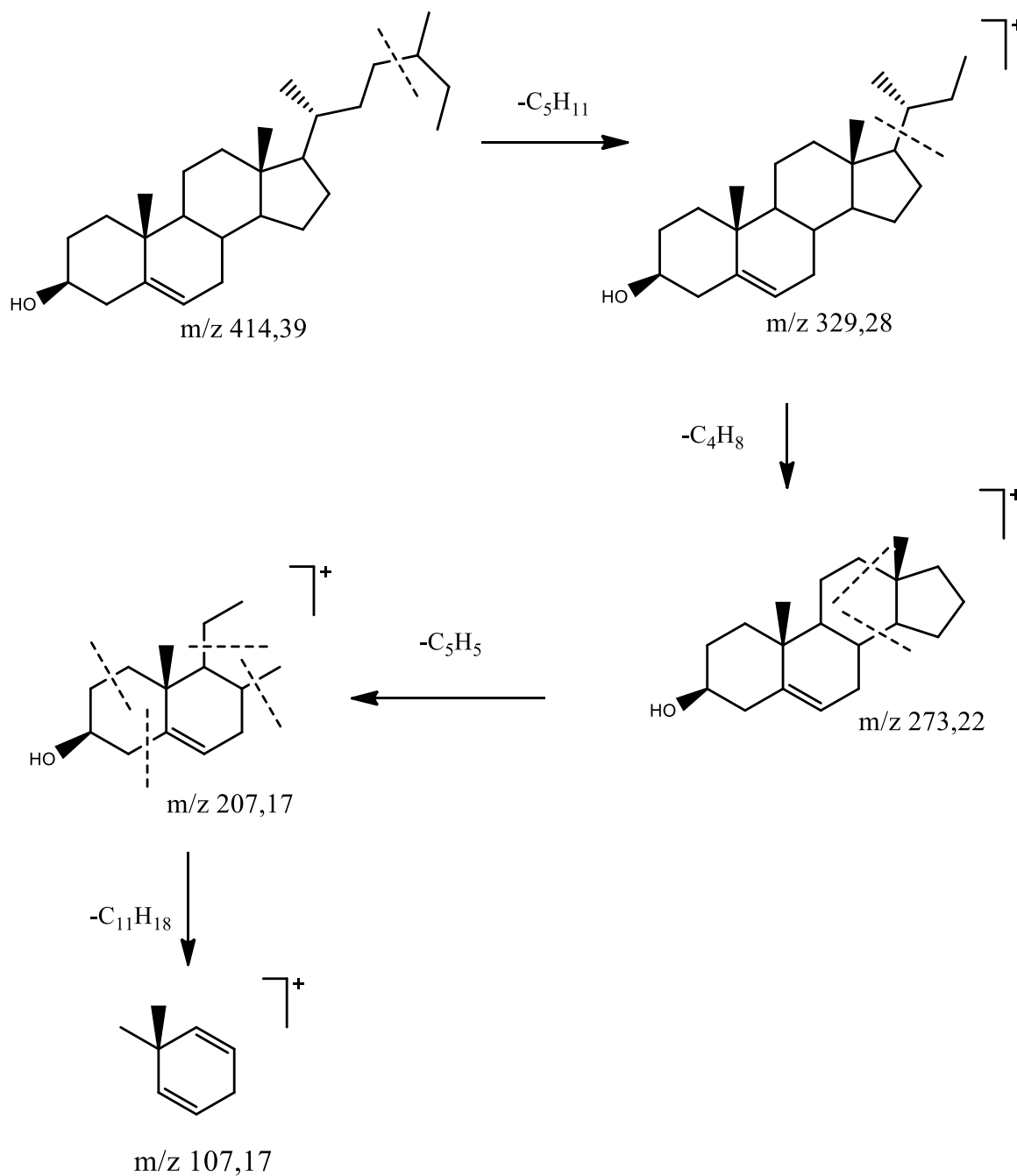
27	1,64 (m)	1,66	0,82 (d, 3H)	0,94 (d, 3H)
28	0,82 (d, $J=1,48$ Hz)	0,81 (d, $J=6,84$ Hz)	-	
29	0,84 (s)	0,84 (d, $J7,50$ Hz)	0,83 (t, 3H)	1,04 (t, 3H)

O  $\beta$ -sitosterol é um esteroide de ampla distribuição e sua ocorrência foi descrita em folhas de *Terminalia glabrecens*, com atividade antiviral relatada frente ao Zika vírus (PEREIRA, 2022). Sua ocorrência em *T. phaeocarpa* é aqui relatada pela primeira vez.



**Figura 39:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para RFJ1135 e expansões ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Adicionalmente, a identificação da amostra RFJ1135 como  $\beta$ -sitosterol foi corroborada pelos dados do espectro de massas ilustrados na **Figura 40**. A partir da análise do espectro obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com impacto eletrônico, foi elaborada uma proposta de fragmentação para o  $\beta$ -sitosterol adaptada de Silva (2014), conforme demonstrado na **Figura 40**.



**Figura 40.** Espectro de massa obtido por GC-MS para a amostra RFJ1135 ( $\beta$ -sitosterol) e proposta de fragmentação para a formação dos fragmentos em  $m/z$  107;  $m/z$  207;  $m/z$  329, adaptada de Silva (2014).

Os compostos  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -sitosterol, identificados neste trabalho, foram isolados da fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa*, que foi ativa frente ao MHV-3 (item 5) e ao SARS-CoV-

2 (item 5.2). No levantamento bibliográfico realizado não se identificou relatos sobre a avaliação da  $\beta$ -amirina e do  $\beta$ -sitosterol frente aos vírus supracitados em ensaios *in vitro*. Todavia, o potencial antiviral dessas substâncias foi investigado em ensaios de ancoragem molecular *in silico* frente a proteínas do SARS-CoV-2.

Nos ensaios por docking realizados por Kumar et al. (2021), a  $\beta$ -amirina apresentou boa capacidade de ligação à Mpro, principal protease do SARS-CoV-2, enquanto o  $\beta$ -sitosterol apresentou moderada capacidade de energia de ligação ( $-48,36$  e  $-40,53$  kcal/mol, respectivamente) sugerindo potencial atividade antiviral (KUMAR et al., 2021). Em outro trabalho, a  $\beta$ -amirina, apresentou energia de interação com a Mpro de  $-44,209$  kcal/mol, enquanto o  $\beta$ -sitosterol mostrou energia de ligação de  $-43.371$  kcal/mol com diversos resíduos da proteína spike do SARS-CoV-2 (GIOFRÈ, et al., 2021). Adicionalmente, a  $\beta$ -amirina e o  $\beta$ -sitosterol apresentaram energia de ligação com a proteína M de  $-9,4$  e  $-9,5$  kcal/mol, respectivamente, formando interações hidrofóbicas com os domínios transmembrana e C-terminal do SARS-CoV-2 (BORKOTOKY et al., (2020). O  $\beta$ -sitosterol apresentou ligação com forte estabilidade ( $-8,66$  kcal/mol) com a glicoproteína spike e RBD-ECA2, sendo considerado pelos autores um alvo terapêutico para o desenvolvimento de fármaco antiviral (SIDDIQUI et al., 2022). Além das interações com a proteína M e C-terminal, o  $\beta$ -sitosteol também apresentou afinidade de ligação significativa à glicoproteína spike do SARS-CoV-2. O *docking* molecular apresentou um escore de  $-119,68$  kcal/mol formando ligação de hidrogênio com as estruturas cristalinas de Asn501 (MAURYA et al., 2020).

No estudo de Sarkar e colaboradores et al. (2022), o  $\beta$ -sitosterol também apresentou interações moleculares relevantes com diferentes proteínas do SARS-CoV-2, evidenciando seu potencial como agente antiviral *multitarget*. O composto apresentou forte afinidade pela região N-terminal da proteína nucleocapsídica, com energia de interação de  $-326,98$  kcal/mol, estabelecendo contatos hidrofóbicos com os resíduos Leu168, Leu162 e Val159. Essas interações sugerem que o  $\beta$ -sitosterol pode atuar estabilizando regiões estruturais críticas envolvidas na ligação da nucleoproteína ao RNA viral, o que pode interferir no empacotamento e replicação do genoma viral. Além disso, o  $\beta$ -sitosterol exibiu a maior propriedade inibitória entre 15 ligantes avaliados frente à enzima NSP15, com energia de ligação de  $-343,98$  kcal/mol, o que indica alta afinidade pelo sítio catalítico e possível bloqueio da atividade endoribonucleásica responsável pela evasão do sistema imune hospedeiro. O composto também apresentou efeito inibitório promissor sobre a helicase NSP13, enzima essencial nos processos de desenvolvimento do RNA durante a replicação viral. (SARKAR et al., 2022). A atividade

da  $\beta$ -amirina também foi relatada frente a proteína TMPRSS2 do SARS-CoV-2, com energia de ligação de  $-10,8 \pm 0,03$  kcal/mol (KAR et al., 2022).

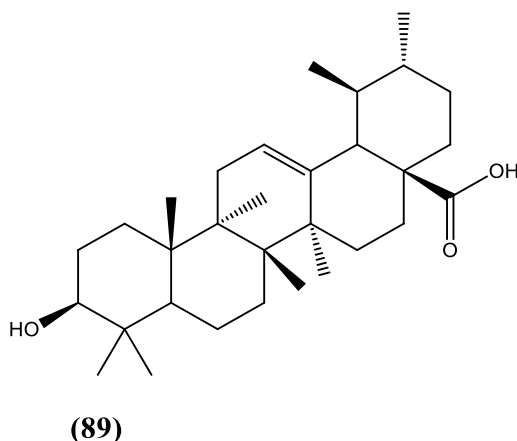
Os resultados das interações moleculares da  $\beta$ -amirina e do  $\beta$ -sitosterol com proteínas-chave do SARS-CoV-2 são altamente significativos no contexto da pesquisa de terapias antivirais. Eles sugerem que esses compostos têm a capacidade de se ligar fortemente a proteínas específicas do vírus, como a protease Mpro e a proteína spike do SARS-CoV-2. Essas interações moleculares podem interferir nos processos de replicação e entrada do vírus nas células hospedeiras, tendo em vista, que a capacidade de interagir com essas proteínas-chave do vírus é crucial porque muitos tratamentos antivirais visam bloquear ou interferir nas funções dessas proteínas para inibir a replicação viral e a entrada do vírus nas células. Assim sendo, quando compostos como a  $\beta$ -amirina e o  $\beta$ -sitosterol demonstram uma forte afinidade por essas proteínas, eles têm o potencial de interromper esses processos virais essenciais. Isso faz com que a  $\beta$ -amirina e o  $\beta$ -sitosterol sejam considerados candidatos promissores no desenvolvimento de terapias antivirais contra o SARS-CoV-2. No entanto, é importante ressaltar que esses resultados são baseados em ensaios *in silico*, sendo, portanto, necessário a realização de estudos adicionais para confirmar e validar a eficácia desses compostos como agentes antivirais efetivos no tratamento da COVID-19.

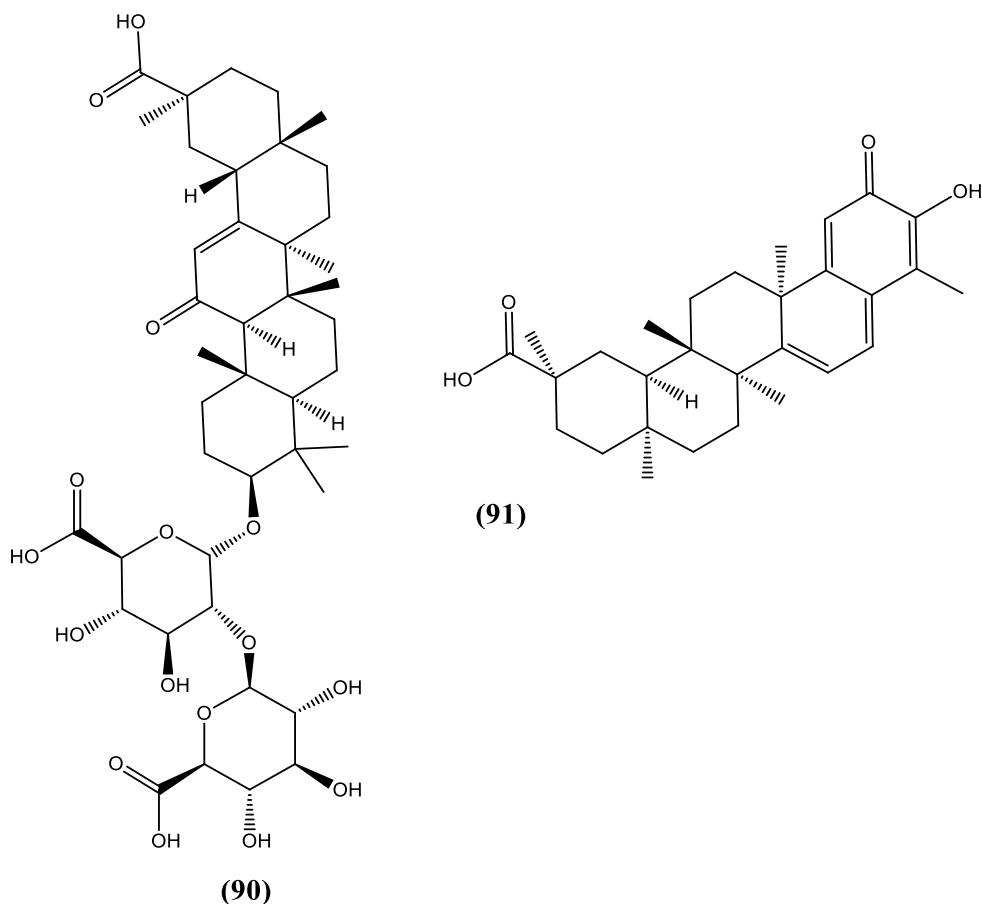
Alguns estudos investigaram o potencial da  $\beta$ -amirina e do  $\beta$ -sitosterol contra diferentes vírus em ensaios *in vitro*. O  $\beta$ -sitosterol mostrou atividade antiviral contra o Zika vírus em células SH-SY5Y, com valores de  $CC_{50} = >300$   $\mu$ M,  $CE_{50} = 71,3 \pm 7,1$   $\mu$ M e  $IS = 4,2$  (PEREIRA, 2022). Este esteroide também reduziu o título viral do HSV-2 em linhagem de células Vero, com valores de  $CC_{50} = 212,8$   $\mu$ g/mL,  $CE_{50} = 2,7$   $\mu$ g/mL e  $IS = 78,8$  (TOUJANI et al., 2018). Já a  $\beta$ -amirina, teve sua atividade antiviral relatada contra o vírus Influenza A e o herpes vírus (RAO et al., 1974).

Cabe ressaltar que até o momento não há relatos sobre a atividade antiviral da  $\beta$ -amirina e do  $\beta$ -sitosterol contra o SARS-CoV-2 em ensaios *in vitro*; todavia, há evidências da atividade anti-SARS-CoV-2 de diversos triterpenos e esteróis (NAVID et al., 2014). O ácido ursólico (**89**), um triterpeno isolado de folhas da *Agrimonia pilosa*, apresentou atividade antiviral em células Vero nas concentrações de 1, 5 e 25  $\mu$ g/mL, promovendo redução da formação de placa de lise em 78,35% na maior concentração. Portanto, o ácido ursólico inibe tanto a replicação do SARS-CoV-2 interferindo na absorção viral, bem como nos estágios de pós-absorção (LEE et al., 2021). Em células Vero E6, a glicirrizina (**90**), um triterpeno pentacíclico isolado de

*Glycyrrhiza glabra*, inibiu a replicação do SARS-CoV-2 nas concentrações de 1 e 4 mM (GOWDA et al., 2021). Este composto foi avaliado por Sand et al. (2021) em células Vero infectadas com SARS-CoV-2, sendo observada inibição do título viral com  $CE_{50}$  de 0,44 mg/mL (SAND et al., 2022). O celastrol (**91**), um triterpeno pentacíclico isolado de *Tripterygium wilfordii*, foi avaliado em células Vero CCL-81 e Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2. O celastrol reduziu significativamente o título viral com de  $CE_{50}$  de 1000 nM frente ao SARS-CoV-2 (FUZO et al., 2022).

Além de serem promissores compostos antivirais, a  $\beta$ -amirina e o  $\beta$ -sitosterol também apresentam ampla atividade anti-inflamatória, o que poderia contribuir para a atividade anti-SARS-CoV-2 (ZHOU et al., 2020; KRISHNAN et al., 2014; ARAGÃO et al., 2008; LOIZOU et al., 2009; AKIHISA et al., 2010; LIAO et al., 2018). Diversas outras atividades biológicas foram relatadas para esses compostos, incluindo antidiabética (BABU et al., 2020), antifúngica (JOHANN et al., 2007), analgésica (ARAGÃO et al., 2008), anti-hiperglicêmica e hipolipidêmica (SANTOS et al., 2012).

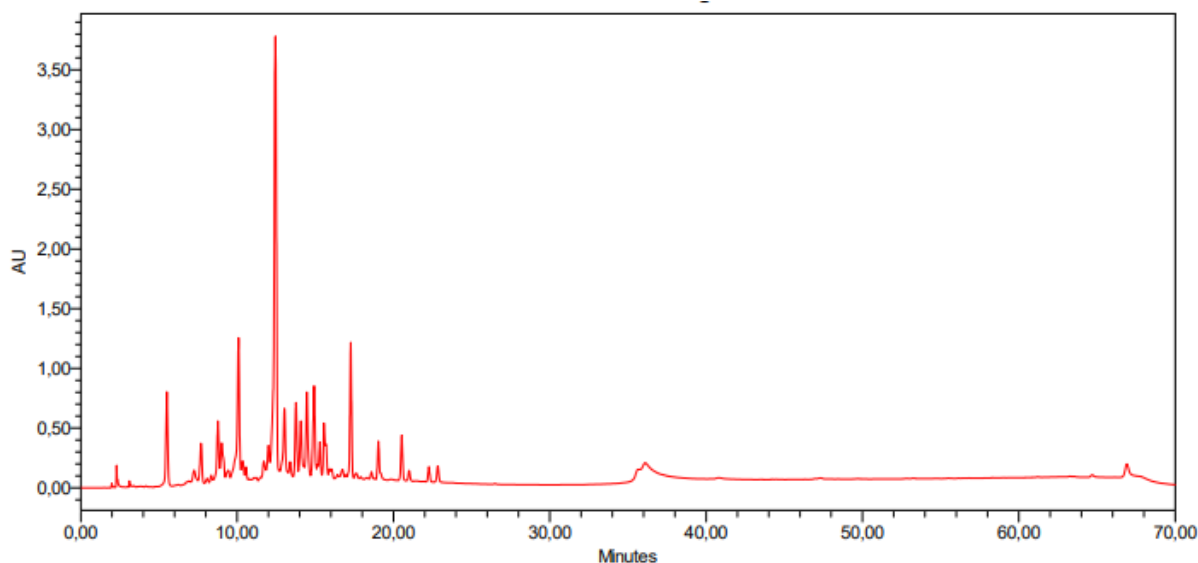




Ressalta-se que os ensaios experimentais envolvendo a  $\beta$ -amirina e  $\beta$ -sitosterol frente ao SARS-CoV-2 ainda estão em desenvolvimento, sendo esses resultados necessários para validar e aprofundar os efeitos antivirais previamente observados nos estudos *in silico* relatados na literatura.

### 5.8.3 Refracionamento da fração EtOAc de *T. phaeocarpa*

A fração EtOAc, obtida por partição do extrato de *T. phaeocarpa* entre solventes imiscíveis (item 4.10), promoveu significativa inibição da replicação do vírus SARS-CoV-2 (item 5.4). Seu perfil cromatográfico obtido por HPLC-PDA (**Figura 41**) indicou o predomínio de constituintes de alta polaridade, com tempo de retenção entre 5 e 25 minutos.

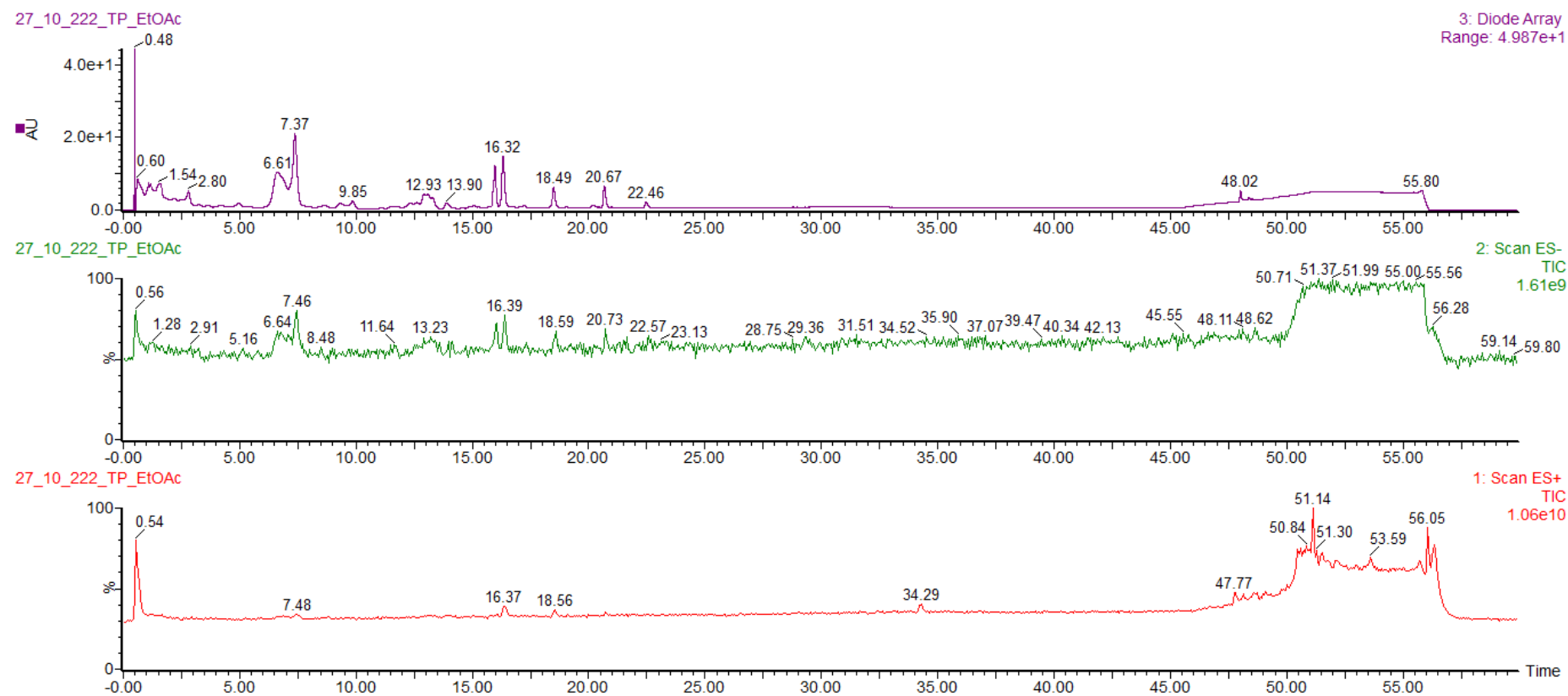


**Figura 41:** Cromatograma obtido por HPLC-PDA para a fração EtOAc de *T. phaeocarpa*. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.23.2.

A fração EtOAc de *T. phaeocarpa* apresentou um perfil cromatográfico de elevada complexidade, bastante semelhante ao observado para o extrato etanólico bruto (item 5.6). Essa semelhança sugere que grande parte dos constituintes do extrato apresenta polaridade intermediária, sendo, portanto, extraída de forma eficiente pelo solvente de partição utilizado.

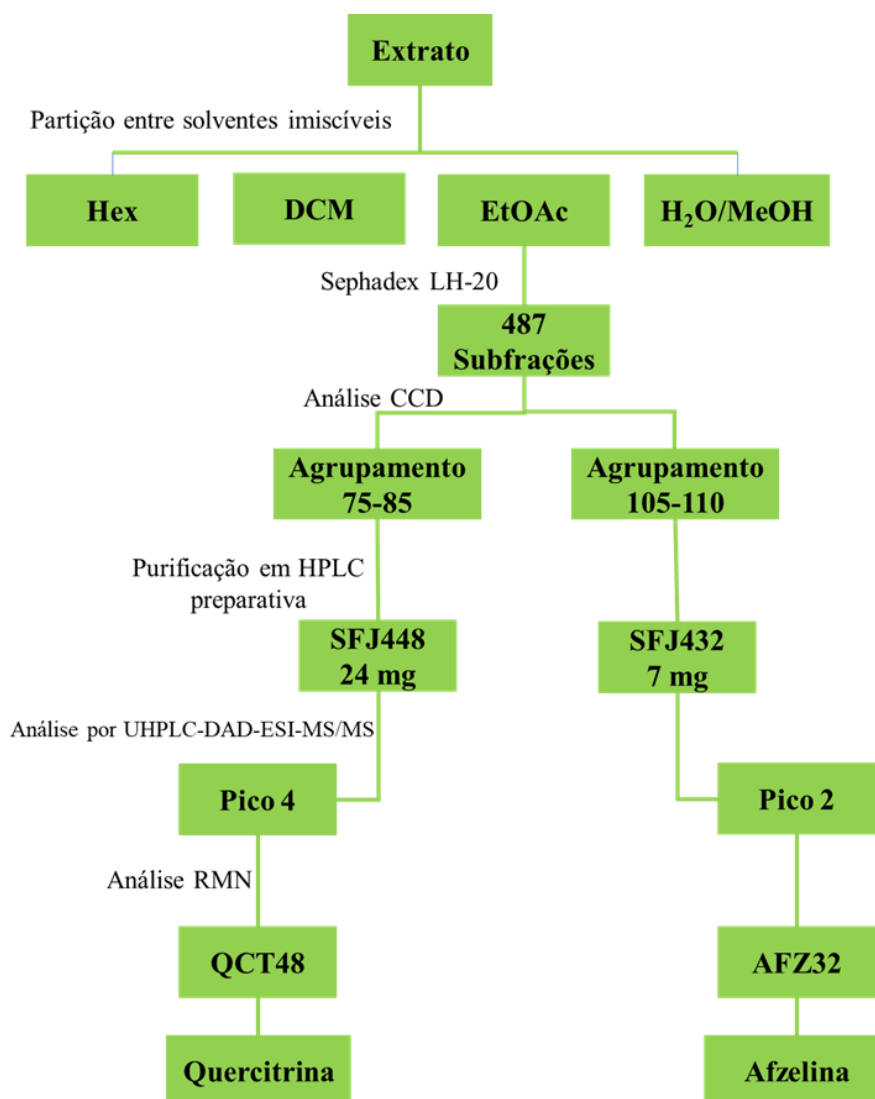
Nos cromatogramas obtidos (detecção por PDA e ESI-MS, nos modos positivo e negativo), observa-se a presença de diversos picos com TR entre 6 e 20 minutos, região típica de eluição de compostos polifenólicos e flavonoides glicosilados (**Figura 42**). Esses metabólitos são frequentemente relatados para espécies do gênero *Terminalia* e estão associados a uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes e antivirais (DWEVEDI et al., 2016). Além disso, a região compreendida entre 50 e 56 minutos mostra um conjunto de picos mais tardios, que podem estar relacionados a taninos elágicos de maior massa molecular ou ainda a triterpenos e derivados menos polares, que tendem a eluir nessa faixa de tempo de retenção.

A manutenção desse perfil após o processo de partição é um dado relevante, pois sugere que os compostos responsáveis pela atividade biológica observada nos ensaios antivirais permanecem concentrados na fração EtOAc. Dessa forma, essa fração se mostra particularmente promissora para estudos posteriores voltados ao isolamento de compostos bioativos.



**Figura 42:** Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para Fr. EtOAc de *T. phaeocarpa* adquiridos (a) no UV, (b) no modo de ionização negativo (ESI-) e (c) no modo de ionização positivo (ESI+). Condições cromatográficas: vide item 4.22.3.1

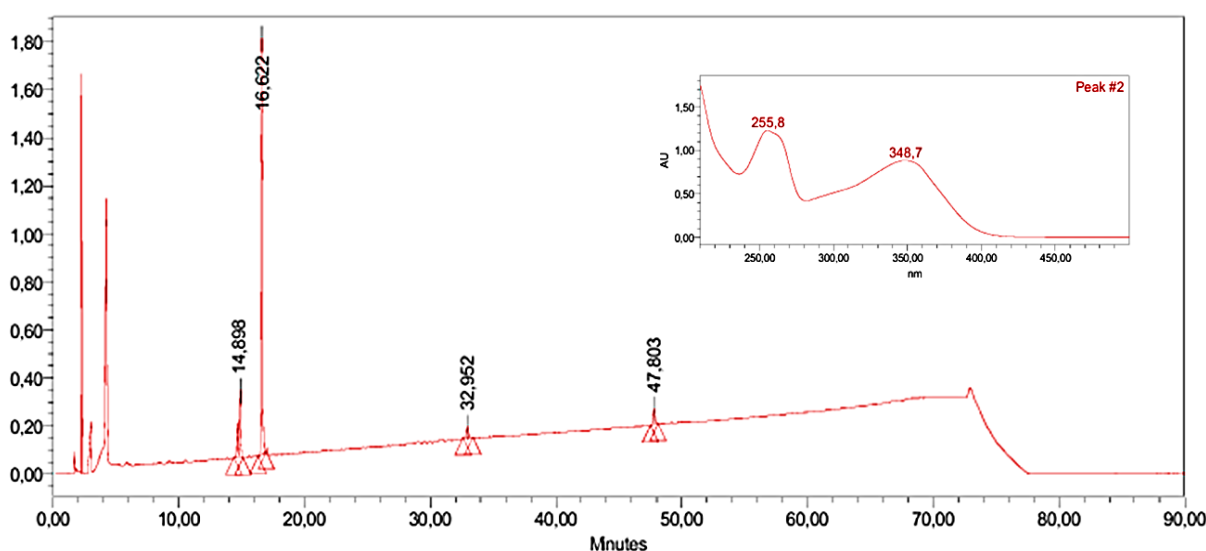
Posteriormente, visando isolar os constituintes bioativos da fração EtOAc, foi realizado seu refração em coluna de Sephadex LH20 (item 4.22.7), conforme fluxograma disposto na **Figura 43**. O refração de EtOAc de *T. phaeocarpa* resultou em 487 frações com rendimento total de 95,2%. Deste total, duas frações eluídas com EtOH 100%, as frações SFJ448 e SFJ432 foram selecionadas para isolamento por HPLC preparativo devido seu perfil cromatográfico simplificado, conforme demonstrado nos cromatogramas das **Figuras 44 e 57**, respectivamente para as frações SFJ448 e SFJ432. Estas frações apresentam baixa complexidade e as massas obtidas mostraram ser viável sua posterior purificação em sistema de HPLC em escala preparativa. Nenhum outro grupo de frações apresentou simultaneamente perfil cromatográfico pouco complexo e massa suficiente para justificar a purificação em HPLC preparativo.



**Figura 43:** Fluxograma do fracionamento do extrato etanólico de *T. phaeocarpa*, refração da fração EtOAc, e frações obtidas para análises por RMN.

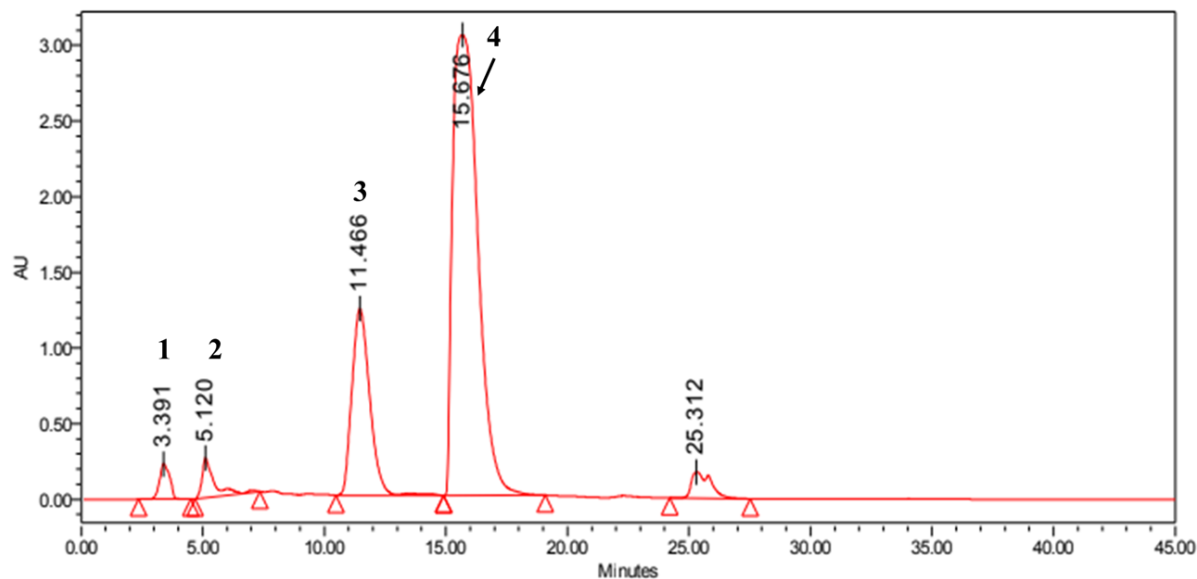
### 5.8.4 Isolamento e elucidación estrutural de QCT48

A fração SFJ448, obtida a partir do refracionamento da fração EtOAc de *T. phaeocarpa* em coluna de Sephadex LH20 (**Figura 44**), foi obtida como um sólido amarelo, com massa total de 190 mg. A análise por CCD de sílica gel (sem revelação) exibiu manchas amarelas, sugerindo a presença de flavonoides. A análise de SFJ448 por HPLC-PDA (**Figura 44**) revelou um pico majoritário com tempo de retenção de 16,62 minutos, cujo espectro de absorção no UV exibiu máximos de 255,8 nm e 348,7 nm. Esses máximos de absorção no UV sugerem que o pico majoritário da fração seja um flavonol substituído na posição C-3 (C-OR).



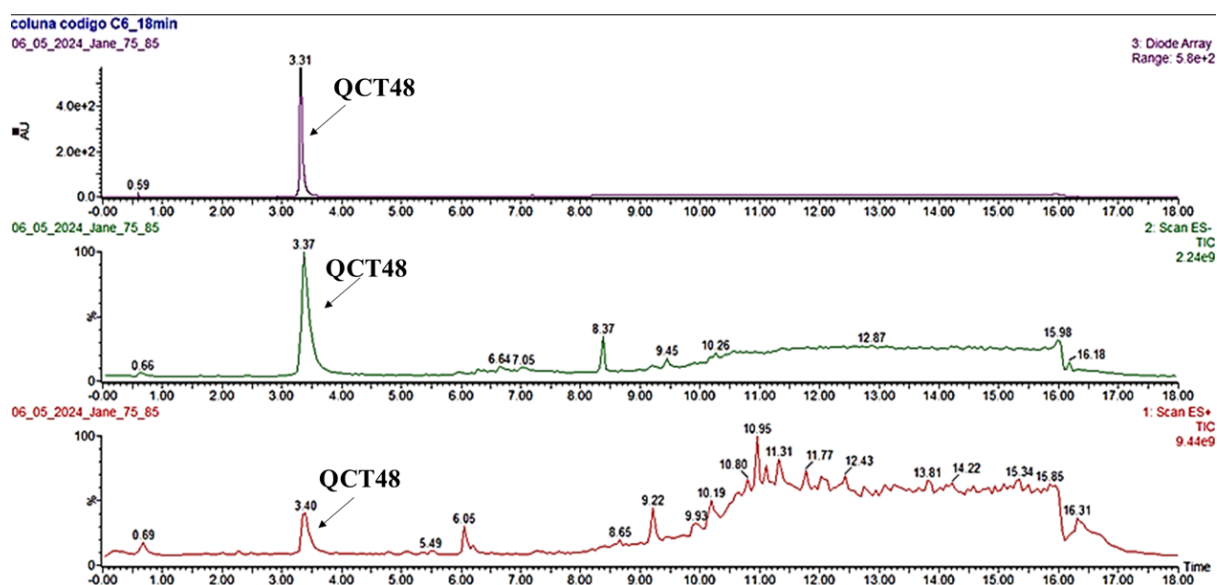
**Figura 44:** Cromatograma obtido por HPLC-PDA para a fração SFJ448 obtida do refracionamento da fração de EtOAc de *T. phaeocarpa*. O espectro no UV foi obtido online para o pico principal ( $t_r = 16,62$  min). Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.23.2.

O cromatograma obtido para SFJ448 indicou que a amostra ainda não apresentava a pureza necessária para a obtenção dos espectros de RMN, visando sua elucidación estrutural. Assim, utilizou-se HPLC em escala preparativa para sua purificação. O perfil cromatográfico obtido no HPLC em escala preparativa da fração SFJ448 está reproduzido na **Figura 45**, destacando o pico majoritário de interesse (pico 4), com tempo de retenção de 15,67 min. Foram realizadas 8 injeções de SFJ448 (massa total de 190 mg) e após a reunião dos eluatos do pico de interesse, obteve-se uma massa total de 24 mg do sólido correspondente ao pico 4. É importante destacar que as 8 injeções realizadas foram reprodutíveis, apresentando perfis cromatográficos similares.



**Figura 45:** Cromatograma obtido por HPLC-UV em escala preparativa para a fração SFJ448 com detecção no UV em 350 nm com destaque para o pico 4 de interesse. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.23.2.

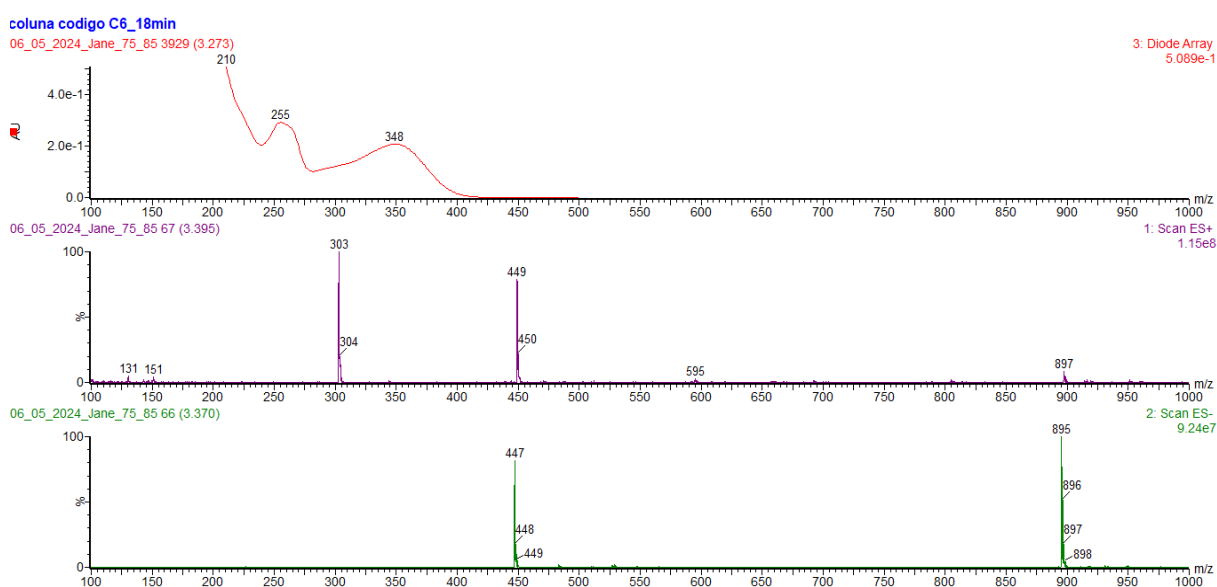
O sólido obtido, eluído como pico 4 no cromatograma da **Figura 46**, foi denominado de substância QCT48 e analisado por UPLC-PDA-ESI-MS/MS. A análise dos cromatogramas indicou que a substância QCT48 possui tempo de retenção de 3,31 min (**Figura 46**).



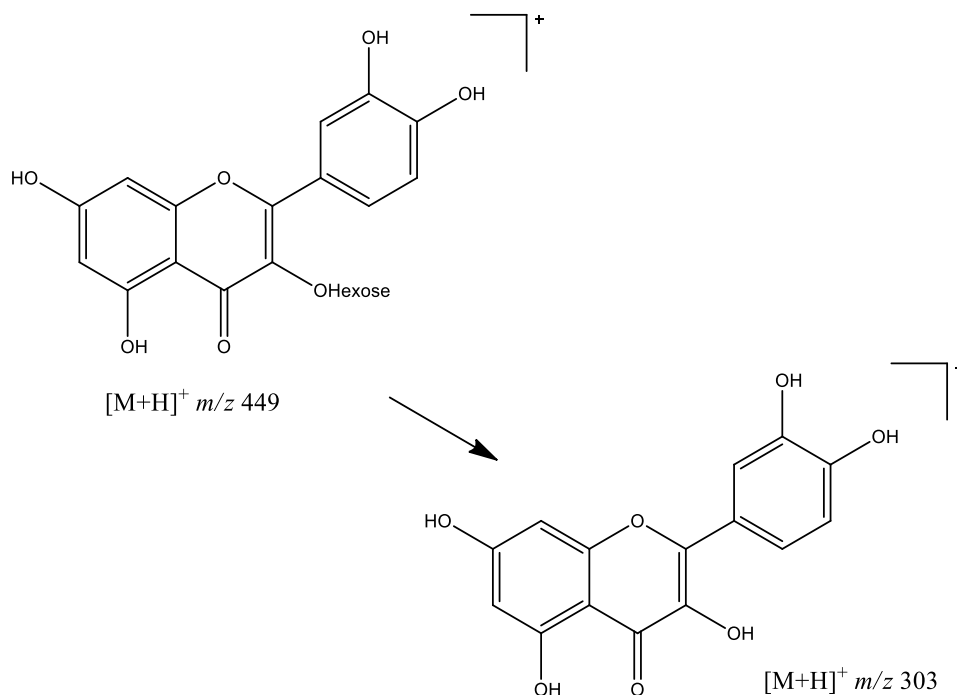
**Figura 46:** Cromatogramas obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância QCT48 obtida do refractionamento de EtOAc de *T. phaeocarpa* adquiridos (a) no UV, (b) no modo de

ionização negativo (ESI-) e (c) no modo de ionização positivo (ESI+). Condições cromatográficas e espectrométricas: vide Parte Experimental, item 4.22.3.

Nos espectros de massa obtidos (**Figura 47**), foram detectados íons com  $m/z$  de 447 Da no modo negativo de ionização e de 449 Da no modo positivo de ionização, que gerou um fragmento em  $m/z$  303 Da. Além disso, foram detectados sinais de dímeros em  $m/z$  895  $[2M-H]^-$  e  $m/z$  897  $[2M+H]^+$ , confirmando a massa molecular de aproximadamente 448 Da para QCT48. Esses dados, juntamente com os máximos de absorção no UV, são compatíveis com um mono heterosídeo da quercetina (**Figura 48**). O fragmento em  $m/z$  303 geralmente está associado à aglicona quercetina (SANTANA, 2018).

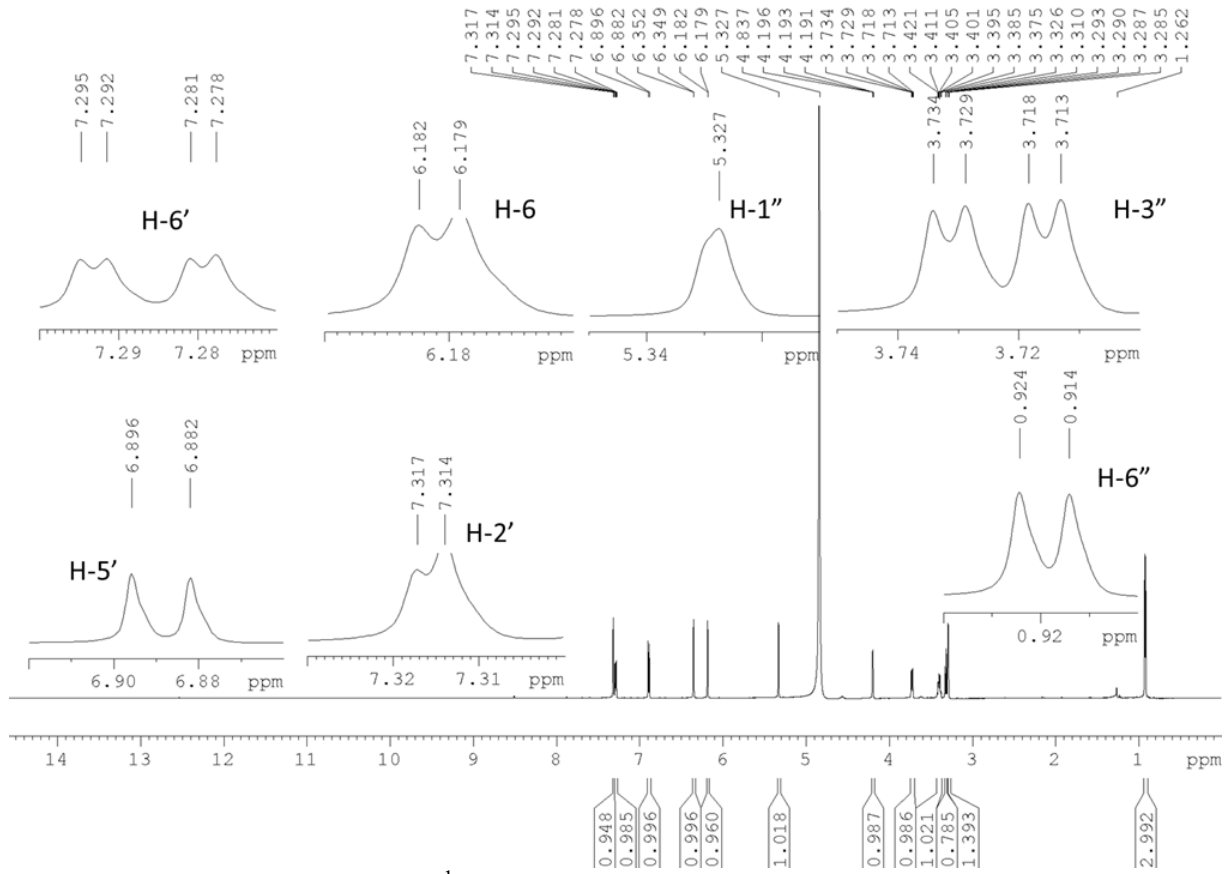


**Figura 47:** Espectros obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância QCT48 adquiridos no UV (vermelho), no modo de ionização positivo (ESI+) (roxo) e no modo de ionização negativo (ESI-) (verde). Condições cromatográficas e espectrométricas: vide Parte Experimental, item 4.22.3.



**Figura 48:** Fragmentação do mono glicosídeo em  $m/z 449 [M+ H]^+$  para gerar a aglicona em  $m/z 303 [M - 147 + H]^+$ . Adaptado de Bastos et al. (2016).

Para confirmar a natureza química da substância QCT48, foram obtidos espectros de RMN mono e bidimensionais. No espectro de  $^1H$  (**Figura 49**), observou-se onze sinais de ressonância. Os dupletos centrados em 6,18 ppm (d;  $J$  1,92 Hz) e em 6,35 ppm (d;  $J$  1,92 Hz) apresentam valores de constante de acoplamento escalar característicos de hidrogênios *meta* posicionados, sendo atribuídos a H-6 e H-8 do anel A. A caracterização do anel B como 1,3,4-trissubstituído foi definida a partir da observação dos dupletos centrados em 7,31 ppm (d;  $J$  1,92 Hz) e 6,89 ppm (d;  $J$  8,29 Hz), característicos dos hidrogênios H-2' e H-5', assim como de um duplete duplo em 7,28 ppm (dd;  $J$  8,29 e 1,92 Hz), atribuído à H-6', com acoplamentos em *orto* ( $J$  8,29 Hz) com o hidrogênio H-5' e em *meta* ( $J$  1,92 Hz) com o hidrogênio H-2' (EFDI et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2019) (**Tabela 19**). A análise do espectro de RMN de  $^1H$  também revelou um simpleto largo em 5,32 ppm (s), atribuído ao hidrogênio anomérico do açúcar, sugerindo a estereoquímica  $\alpha$  para a ligação glicosídica. Já o duplete centrado em 0,91 ppm (d;  $J$  6,1 Hz) com integral de três hidrogênios, é característico de hidrogênios metílicos, sugerindo a presença de uma unidade ramnosídica (**Tabela 19**) (CARDOSO et al., 2013).



**Figura 49:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a substância QCT48 e expansões ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz).

**Tabela 19:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) e dados da literatura relatados para a quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo (quercitrina) ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $^{\text{a,b}}$ 400 MHz,  $^{\text{c}}$  $\text{CD}_3\text{OD}$  500 MHz).

$^1\text{H}$	QCT48 $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<sup>a</sup> VECHIA et al. (2016) $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<sup>b</sup> OLIVEIRA et al. (2019) $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<sup>c</sup> Souza et al. (2006) $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)
1	-	-	-	
2	-	-	-	
3	-	-	-	
4	-	-	-	
5	-	-	-	
6	6,18 (d; <i>J</i> 1,92)	6,20 (d; <i>J</i> 2)	6,14 (d; <i>J</i> 2,0)	6,19 (d; <i>J</i> 2,0)
7	-	-	-	
8	6,35 (d; <i>J</i> 1,92)	6,37 (d; <i>J</i> 2,1)	6,30 (d; <i>J</i> 2,0)	6,36 (d; <i>J</i> 2,0)
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	
2'	7,31 (d; <i>J</i> 1,92 Hz)	-	7,29 (d, <i>J</i> 2,0 Hz)	7,33 ( <i>J</i> 2,0 Hz)
3'	-	-	-	
4'	-	-	-	
5'	6,89 (d; 8,29 Hz)	-	6,86 (d, 8,3 Hz)	6,91 ( <i>J</i> 8,0 Hz)
6'	7,28 (dd; <i>J</i> 8,29 e 1,92 Hz)	-	7,25 (dd, 8,3 e 2,0 Hz)	7,30 ( <i>J</i> 8,0 e 2,0 Hz)
1''	5,32 (s)	5,35 (d; <i>J</i> 1,5 Hz)	5,30 (d, <i>J</i> 1,4 Hz)	5,34 ( <i>J</i> 1,5 Hz)
2''	4,19 (m)	4,23 (dd; <i>J</i> 3,4 e 1,5 Hz)	-	4,21(dd; <i>J</i> 3,0 e 1,5 Hz)
3''	3,72 (dd; <i>J</i> 9,42 e 3,18 Hz)	3,76 (dd; <i>J</i> 9,4 e 3,4 Hz)	3,71 (dd, <i>J</i> 9,3 e 3,4 Hz)	3,75 (dd; <i>J</i> 9,5 e 3,5 Hz)
4''	3,32 (dd; <i>J</i> 9,42 e 3,18 Hz)	3,35 (dd; <i>J</i> 9,4 e 3,4 Hz)	3,27 (m)	3,32 (m)
5''	3,41 (m)	3,43 (dd; <i>J</i> 9,4 e 6,1 Hz)	3,38 (m)	3,42 (m)
6''	0,91 (d; <i>J</i> 6,12 Hz)	0,94 (d; <i>J</i> 6,1 Hz)	0,90 (d); <i>J</i> 6,1 Hz)	0,94 (d; <i>J</i> 6,0 Hz)

Já no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de CQT48 (**Figura 50**) foram detectados 21 sinais de ressonância, confirmando tratar-se de um monoglicosídeo de flavonoide. Destaca-se um sinal com deslocamento químico em 179,6 ppm, característico de carbonila, referente ao carbono C-4 do anel C. Além disso, foram observados dois sinais em 94,7 e 99,8 ppm, característicos dos carbonos C-6 e C-8 do anel A, semelhante ao que foi anteriormente descrito por Fajriah et al. (2018).

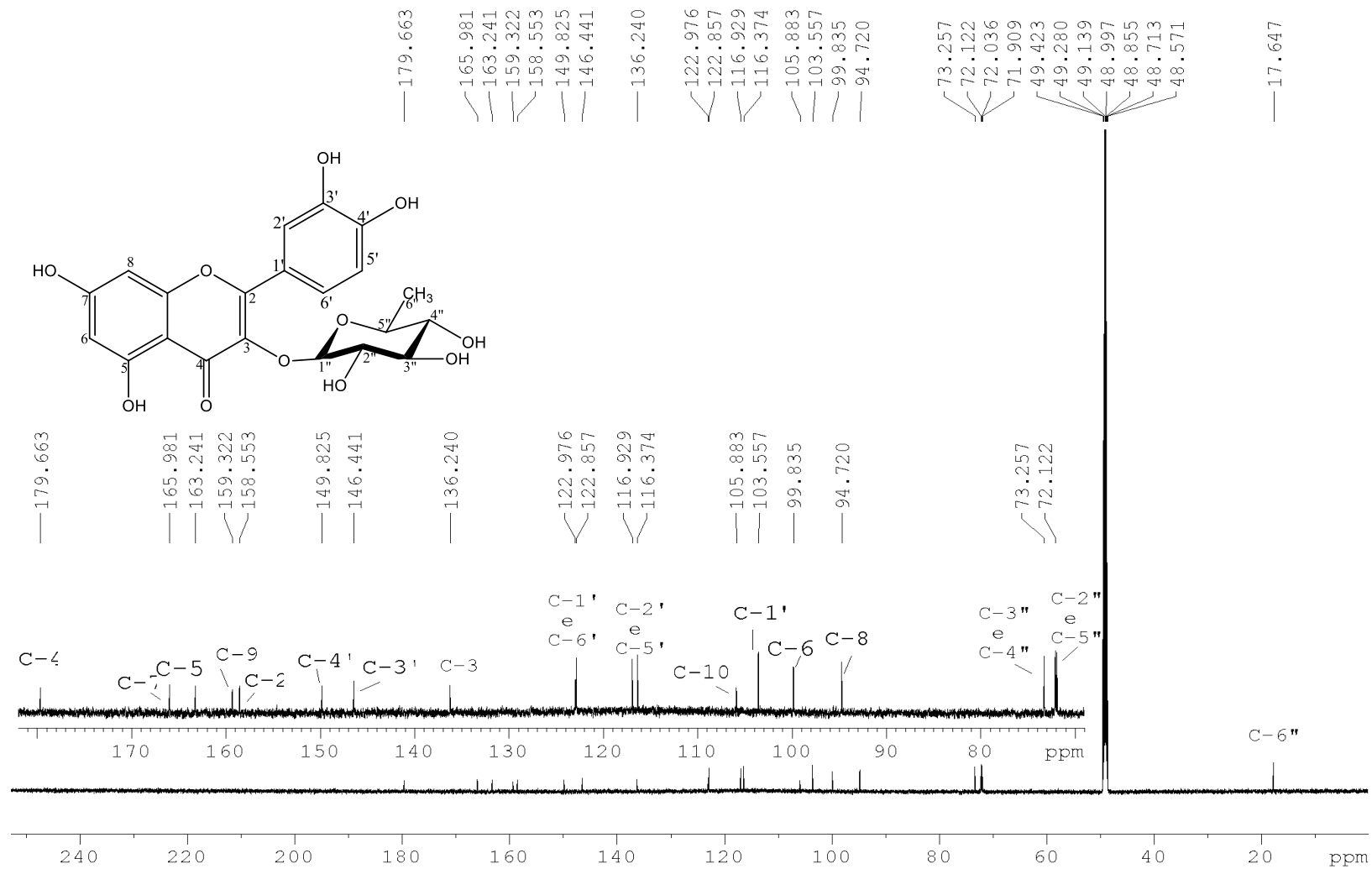


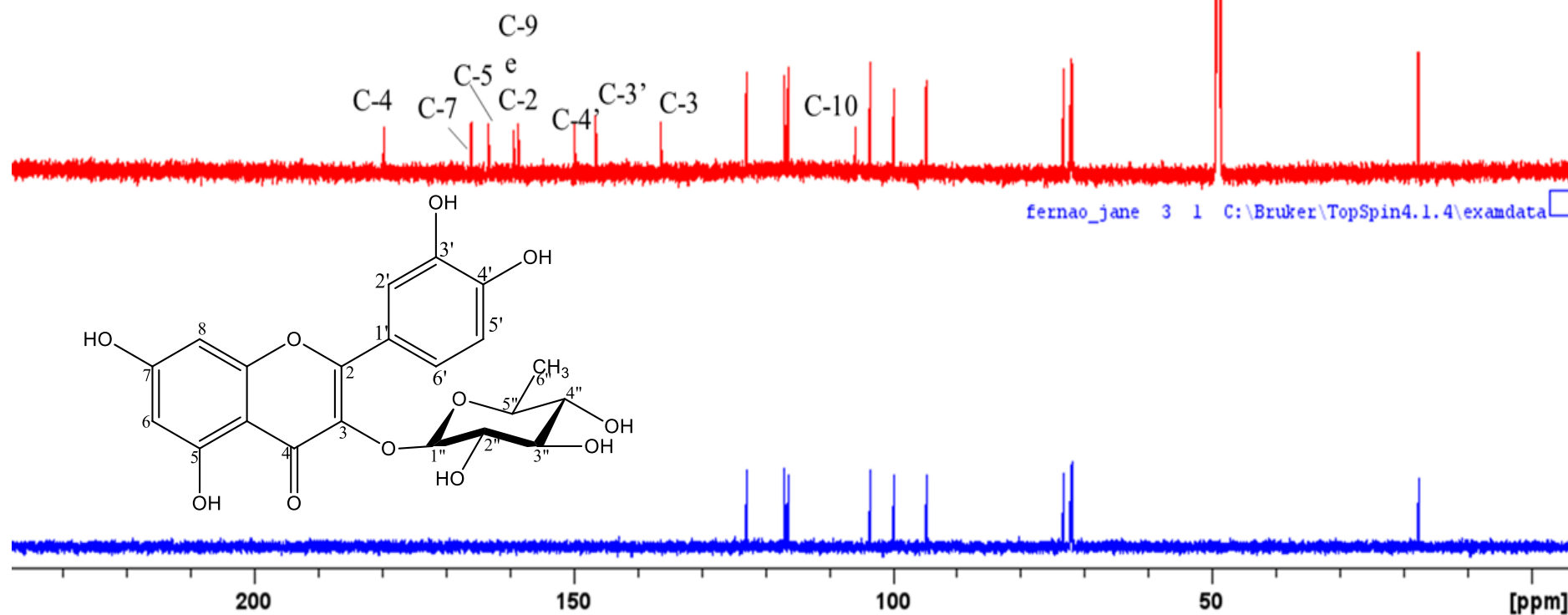
Figura 50: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz).

Prosseguiu-se com a análise do subspectro DEPT-135, que é uma ferramenta essencial para distinguir carbonos metínicos, metilênicos e metílicos. A análise permitiu identificar esses tipos de carbono e, como esperado, a ausência do carbono carbonílico neste subspectro (**Figura 51 e 52**), uma vez que se trata de carbono não hidrogenado. De forma semelhante, cabe destacar a ausência de 4 sinais entre 146,4 e 165,9 ppm correspondentes aos carbonos não hidrogenados ligados às hidroxilas fenólicas. Portanto, a presença de 10 sinais de carbonos não hidrogenados é compatível com um esqueleto do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, característico de flavonoides, composto por dois anéis benzênicos (A e B) interligados por um anel heterocíclico de seis membros (anel C), do tipo pirano, formado por três carbonos e um átomo de oxigênio (DIAS et al., 2021).

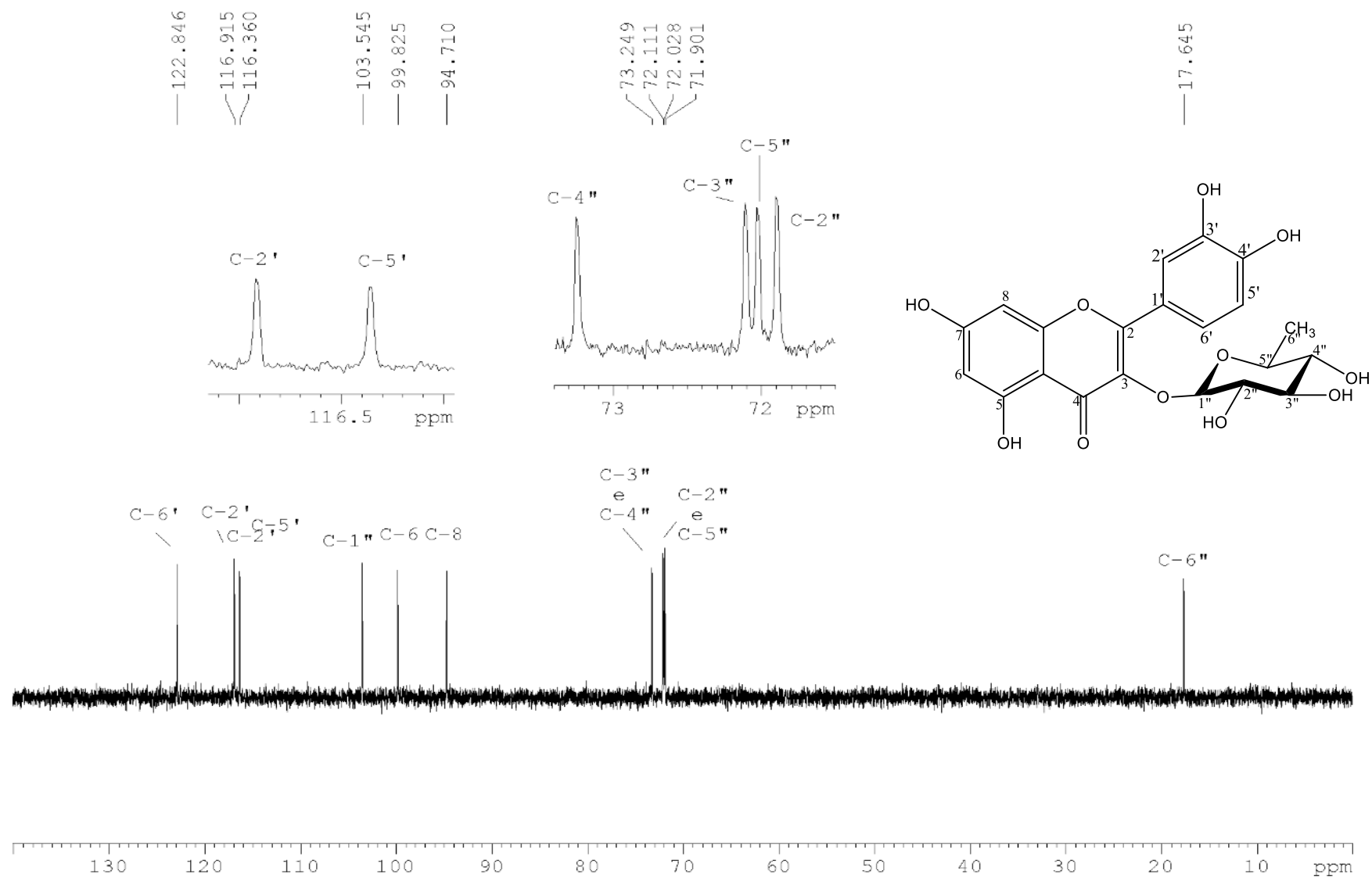
A análise do subspectro DEPT-135 (**Figura 50**) na região de 17 a 125 ppm permitiu observar a ocorrência de dez sinais de ressonância. Os sinais em 71,9 a 73,2 ppm e 103,5 ppm foram atribuídos aos carbonos oximetínicos do açúcar, enquanto o sinal em  $\delta$ 17,6 ppm é característico do carbono metílico C6", apresentando valores de deslocamento químico próximos aos descritos por Cardoso et al. (2013) para a unidade de ramnose.

fernao\_jane 3 1 C:\Bruker\TopSpin4.1.4\examdata

fernao\_jane 2 1 C:\Bruker\TopSpin4.1.4\examdata



**Figura 51:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (a) e subspectro DEPT-135 (b) obtidos para substância QCT48, com a atribuição dos sinais de ressonância do carbono carbonílico e dos carbonos substituídos com hidroxilas fenólicas (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**Figura 52:** Expansões do subspectro DEPT-135 obtidos para a substância QCT48 (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

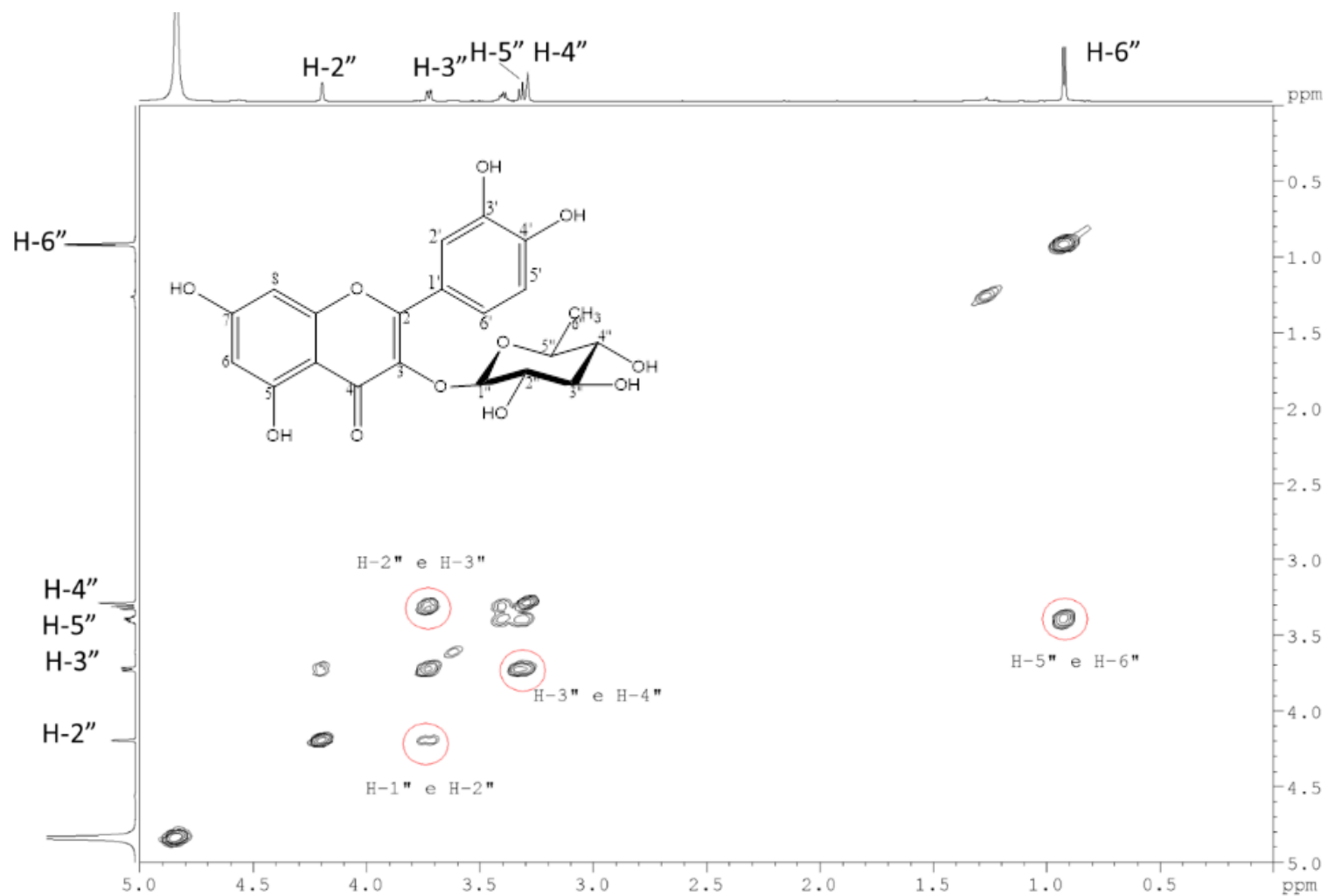
A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  revelou, também, dois sinais com deslocamento químico em 136,48 e 158,72 ppm, atribuídos aos carbonos olefínicos C-3 e C-2, respectivamente (MEHRBOD et al., 2018). Além disso, identificou-se o sinal em 103,5 ppm, característico do carbono anomérico C-1'', confirmando a presença de uma unidade de L-ranose (OLIVEIRA et al., 2019). Os valores de deslocamentos químicos apresentados na **Tabela 20** mostram uma correspondência entre os 21 sinais identificados no presente estudo e aqueles previamente descritos na literatura para a quercitrina.

**Tabela 20:** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz) e comparação com dados da literatura para a quercitrina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $^{\text{a}}$ 125 MHz e  $^{\text{b}}$ 100 MHz).

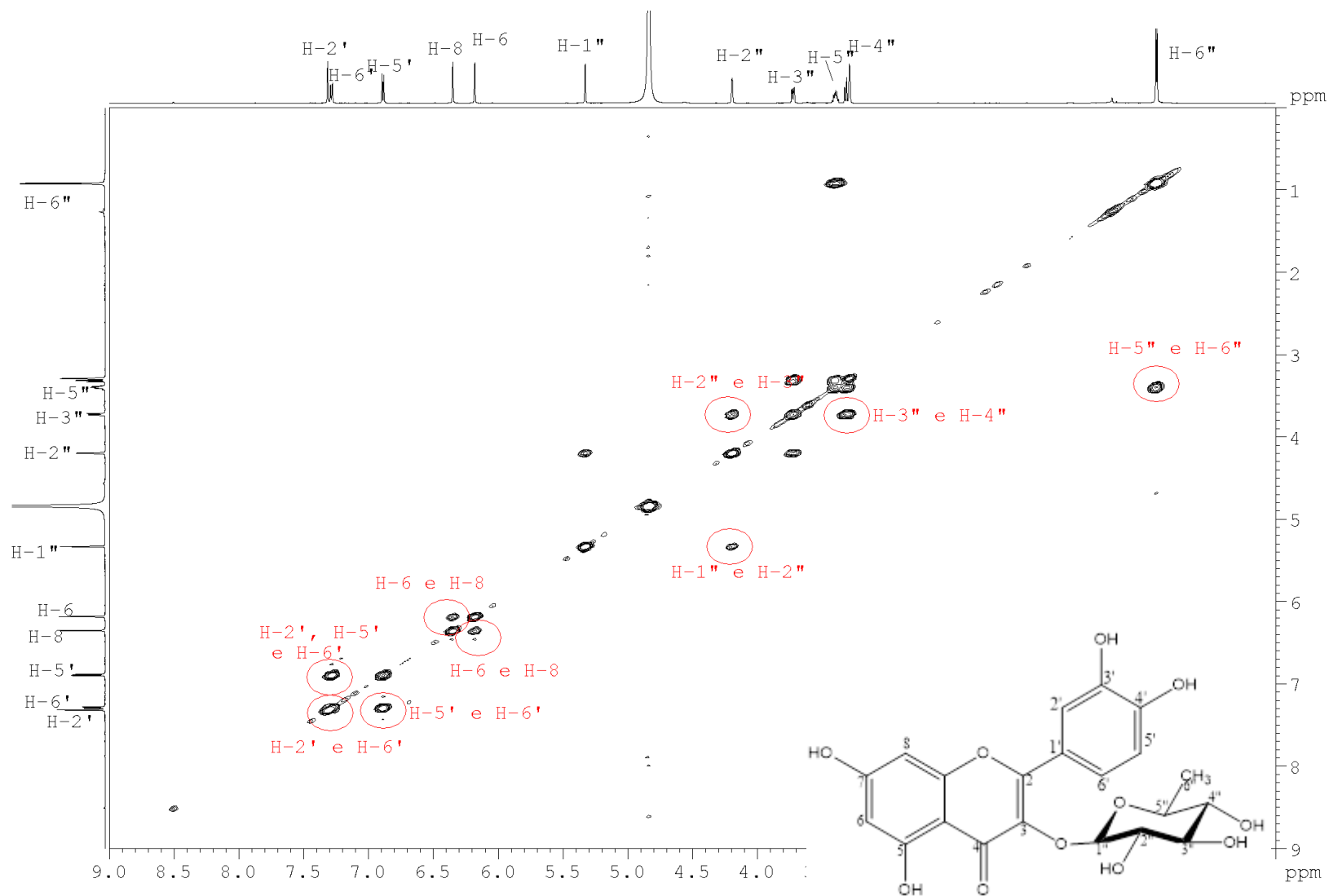
$^{13}\text{C}$	Atribuições	QCT48 $\delta$ (ppm)	$^{\text{a}}$ EFDI et al. (2022) $\delta$ (ppm)	$^{\text{b}}$ OLIVEIRA et al. (2019) $\delta$ (ppm)
1	-	-	-	
2	C	158,5	158,7	158,4
3	C	136,2	136,4	136,2
4	C=O	179,6	179,8	179,6
5	C-OH	163,2	163,4	163,1
6	C-H	99,8	100,3	99,8
7	C-OH	165,9	166,8	165,8
8	CH	94,7	95,1	94,7
9	C	159,3	159,3	159,2
10	C	105,8	105,9	105,8
1'	C	122,9	123,1	122,9
2'	CH	116,9	117,2	116,9
3'	C-OH	146,4	146,6	146,3
4'	C-OH	149,8	149,9	149,7
5'	CH	116,3	116,6	116,3
6'	CH	122,8	122,9	122,8
1''	CH	103,5	103,8	103,5
2''	CH	71,9	72,2	71,8
3''	CH	72,1	72,7	72,1
4''	CH	73,2	73,5	73,2
5''	CH	72,0	74,8	72,0
6''	$\text{CH}_3$	17,6	17,9	17,6

As atribuições dos sinais de ressonância de hidrogênio da unidade de açúcar foram confirmadas pelas correlações observadas no mapa de contornos homonuclear COSY (**Figuras 53 e 54**). A análise dos espectros indica que a atribuição dos sinais de prótons está de acordo com os deslocamentos químicos previamente descritos por Oliveira et al. (2019). Dessa forma, foi possível observar o acoplamento ( $^3J_{aa}$ ) entre H-3''/H-4''. Além disso, o hidrogênio H-6'', por

ser o único com integral correspondente a três átomos de hidrogênio, possibilitou a atribuição do sinal referente ao hidrogênio H-5", por ser o único que acopla com o H-6" ( $^3J$ ).



**Figura 53:** Expansão do mapa de contornos COSY demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de  $^1\text{H}$  via  $^3J$  obtido para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz).

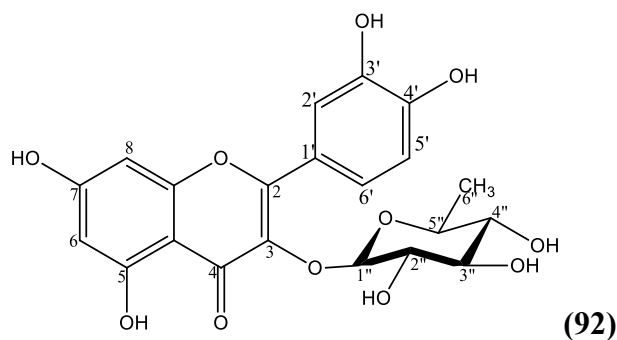


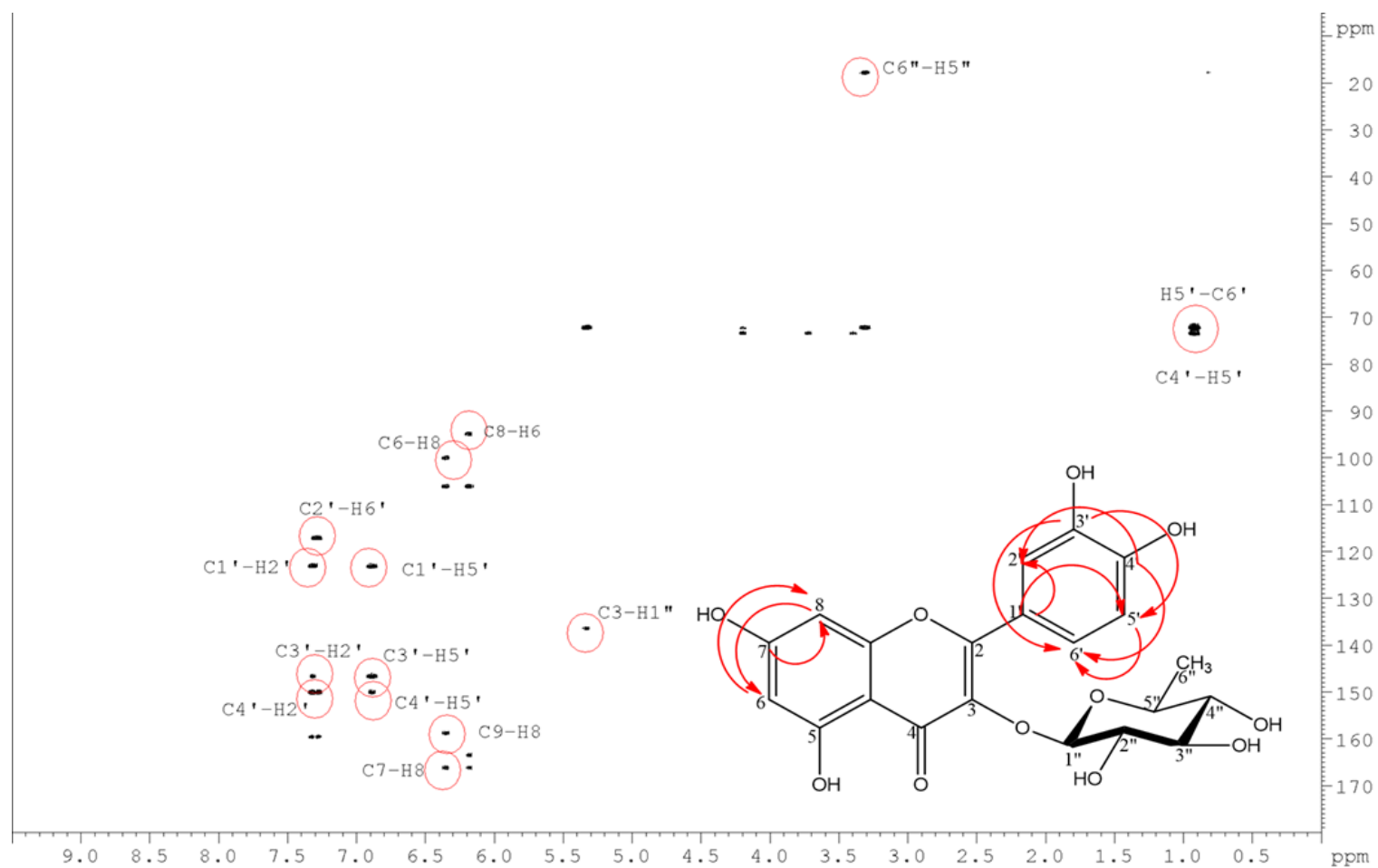
**Figura 54:** Mapa de correlação mononuclear COSY obtido para a substância QCT48 (CD<sub>3</sub>OD; 600 MHz).

Para confirmar a atribuição dos sinais de RMN da substância QCT48, foi obtido o mapa de contornos HMBC, que identifica acoplamentos escalares heteronucleares entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , ou seja, ligação químicas distantes, especificamente de  $^2J$  a  $^4J$  (**Figura 55**) (Pavia et al., 2010). A expansão da região empregada para a atribuição dos sinais está representada na **Figura 56**. Nela foi possível observar mancha de correlação entre os sinais de ressonância do hidrogênio anomérico H-1'' em 5,23 ppm e o carbono C-3 em 136,6 ppm ( $^3J$ ), o que confirma que a unidade da ramnose está ligada ao carbono C-3, conforme relatado anteriormente por Efdi et al. (2022) e demonstrado na **Figura 56**.

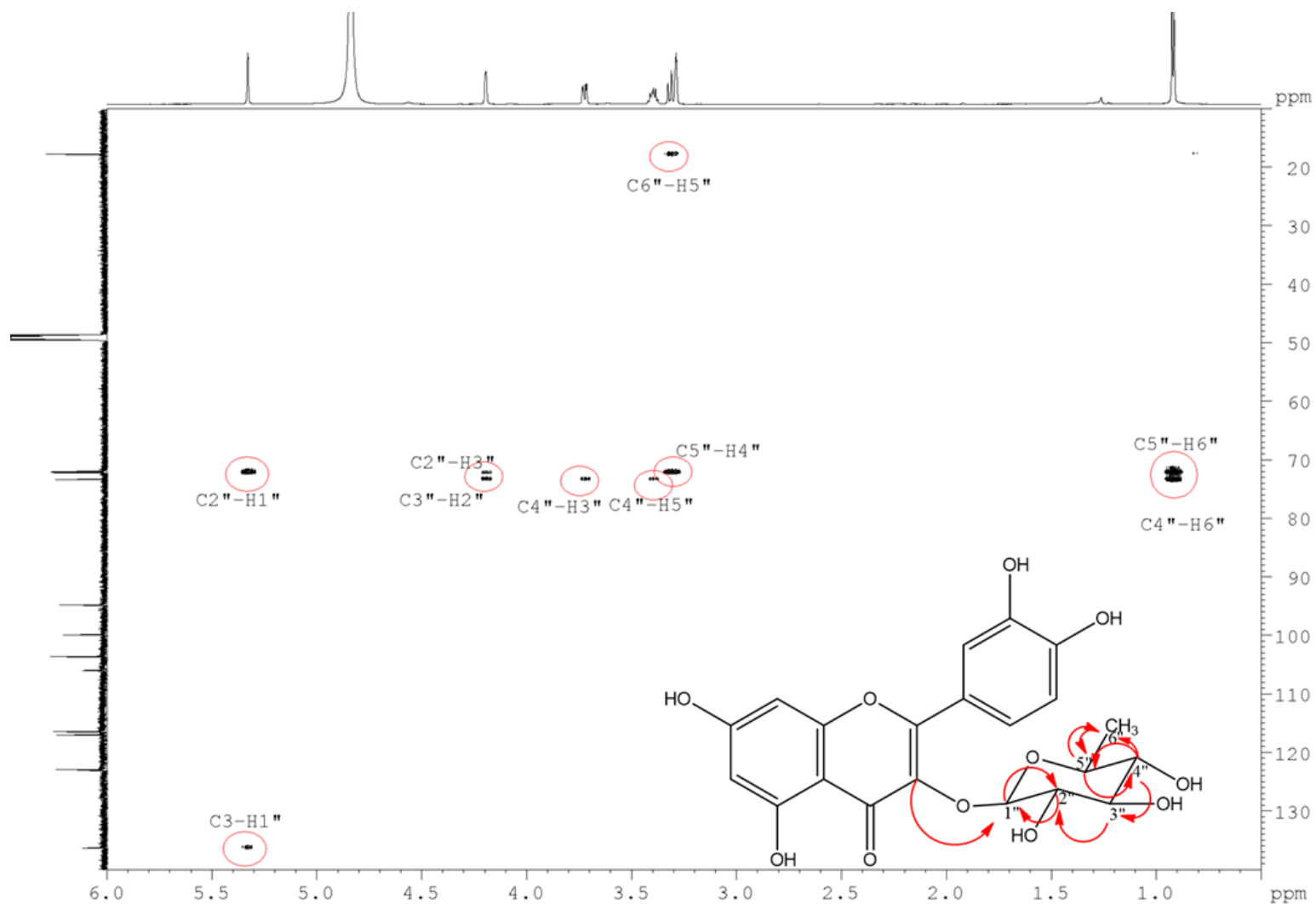
Adicionalmente, foram identificadas manchas de correlação entre os sinais referentes aos hidrogênios metílicos H-6'' em 0,91 ppm e os sinais atribuídos ao carbono C-5'' em 72,0 ppm e ao carbono C-4'' em 73,2 ppm. Observou-se, ainda, os acoplamentos em  $^2J$ , respectivamente de H-2'' com C-3'', de H-3'' com C-2'', de H-4'' com C-5'' e de H-5'' com C-4'' (**Figura 56**).

A análise dos dados espectrais obtidos para substância QCT48 e comparação com dados relatados na literatura permitiu identificá-la inequivocamente como sendo a quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo (quercitrina) (**92**). A quercitrina é um flavonoide amplamente distribuído, com ocorrência relatada em diferentes espécies vegetais. Na espécie *T. phaeocarpa*, entretanto, sua identificação foi registrada apenas no estudo de Gomes et al. (2021). Os autores relataram a identificação putativa do composto por meio de análises de LC-MS/MS. Portanto, este é o primeiro relato de isolamento e caracterização inequívoca de quercitrina em *T. phaeocarpa*.





**Figura 55:** Mapa de contorno heteronuclear HMBC demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  via  $^3J$  para a substância QCT48 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 600 MHz para  $^1\text{H}$  e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).



**Figura 56:** Mapa de contorno heteronuclear HMBC demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de  $^1H$  e  $^{13}C$  via  $^3J$  para os sinais da ramnose ( $CD_3OD$ ; 600 MHz para  $^1H$  e 150 MHz para  $^{13}C$ ).

A quercitrina tem sido amplamente reconhecida como um flavonoide de interesse farmacológico devido ao seu potencial antioxidante (TANG et al., 2019), anti-inflamatório (KAGAMBEGA et al., 2020; LEE et al., 2023) e antimicrobiano (MACDONALD et al., 1983; LIU et al., 2015).

Sua potencial atividade antiviral foi relatada em ensaio de *docking* molecular com proteínas essenciais do SARS-CoV-2. A quercitrina demonstrou forte afinidade pelo sítio catalítico da protease principal (3CLpro), com um escore de ligação de -9,043 kcal/mol, sugerindo um potencial efeito inibitório sobre a replicação viral (CHIKHALE et al., 2021). A interação foi mediada por múltiplas ligações de hidrogênio: o grupo hidroxila do anel de cromenona (anel C) interagiu com o resíduo de Arg 188, enquanto os grupos hidroxila da porção glicosídica formaram ligações de H bifurcadas com Thr 26, Gly 143 e Asn 142. Por sua vez, o anel fenila estabeleceu ligação de H com Glu 166, enquanto a carbonila do anel de cromenona apresentou interação adicional com Cys145. Essas múltiplas interações destacam a capacidade da quercitrina de ocupar de forma estável o sítio ativo da protease, bloqueando potencialmente a clivagem de polipeptídeos virais necessária para a produção de proteínas funcionais (CHIKHALE et al., 2021).

Por sua vez, Chikhale et al. (2020) demonstraram que a quercitrina é um inibidor potencial do TMPRSS2, enzima crucial para a entrada do SARS-CoV-2 nas células. Nos experimentos de *docking* molecular, a quercitrina interagiu com resíduos-chave do sítio ativo, incluindo Gln377, Thr447, Lys449 e Ile452, formando múltiplas ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Durante a simulação de dinâmica molecular de 100 ns, o complexo TMPRSS2-quercitrina apresentou RMSD (Desvio Médio Quadrático) médio de 3,337 Å, valor que reflete a variação estrutural média do complexo ao longo do tempo e indica que este permaneceu relativamente estável sem grandes alterações conformacionais. Já a análise de RMSF (Flutuação Média Quadrática) revelou valor médio de 1,414 Å, refletindo baixas flutuações nos resíduos do sítio ativo, o que sugere sua rigidez estrutural durante a interação com a quercitrina. O cálculo da energia livre de ligação via MM-GBSA (Mecânica Molecular – Área de Superfície de Born Generalizada), revelou energia de -50,570 kcal/mol, superior ao camostat (-25,00 kcal/mol) e próxima ao ambroxol (-44,48 kcal/mol), ambos utilizados como controles positivos por serem previamente relatados como inibidores de TMPRSS2. Esses dados sugerem que a quercitrina possa efetivamente inibir o TMPRSS2, reforçando seu potencial como produto natural promissor para desenvolvimento antiviral.

Outras evidências da potencial atividade da quercitrina frente ao SARS-CoV-2 foram obtidas no estudo de Zhang et al. (2022). Os autores empregaram uma análise integrada de triagem, modelagem molecular e simulação dinâmica no estudo de *Saussurea involucreta*, resultando na identificação da quercitrina como um dos cinco constituintes ativos da espécie, juntamente com o  $\beta$ -sitosterol, também isolado no presente neste estudo. A quercitrina apresentou elevada afinidade por mediadores inflamatórios desencadeados pela infecção do SARS-CoV-2, destacando-se IL-1 $\beta$  e IL6, relacionados à tempestade de citocinas, além da proteína AKR1B1, validada como alvo promissor pelo bom desempenho em simulações dinâmicas. Já o  $\beta$ -sitosterol mostrou interação relevante com CASP8 e CASP3, proteínas envolvidas na apoptose e resposta celular. De forma geral, os dois compostos demonstraram atuar de forma multitarget, ou seja, não se restringem a um único alvo molecular, mas interagem com diversas proteínas simultaneamente. Essa característica permite modular, de maneira integrada, múltiplas vias biológicas associadas à infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2, incluindo processos de inflamação, apoptose e estresse oxidativo, o que reforça seu potencial como candidatos naturais no contexto da COVID-19 (ZHANG et al., 2022).

Além do potencial efeito sobre o SARS-CoV-2, a atividade antiviral da quercitrina já foi relatada frente a outros vírus. Assim, Ling et al. (2020) demonstraram que a quercitrina isolada da *Houttuynia cordata* é ativa frente o vírus Influenza H1N1. Em experimentos *in vivo*, o tratamento com quercitrina (50, 100 e 200 mg/kg) aumentou a sobrevivência e o tempo de vida dos camundongos infectados. Adicionalmente, o tratamento reduziu a perda de peso e a lesão pulmonar aguda induzida pelo H1N1, além de preservar a microarquitetura pulmonar e promover menor infiltração inflamatória. Em ensaios *in vitro*, a quercitrina inibiu a replicação viral e a sinalização de TLR nas células. Assim, o tratamento de células RAW 264.7, com o extrato da *Houttuynia cordata* (50, 100 e 200  $\mu$ g/mL) infectadas com H1N1 reduziu de forma concentração-dependente a atividade da neuraminidase (NA) e a proliferação viral. Adicionalmente, a quercitrina foi capaz de restringir a fosforilação de NF- $\kappa$ B p65, a translocação nuclear e a secreção de citocinas estimuladas por agonistas de TLR. Estes resultados demonstram que a quercitrina interfere tanto na replicação viral quanto na ativação da resposta inflamatória.

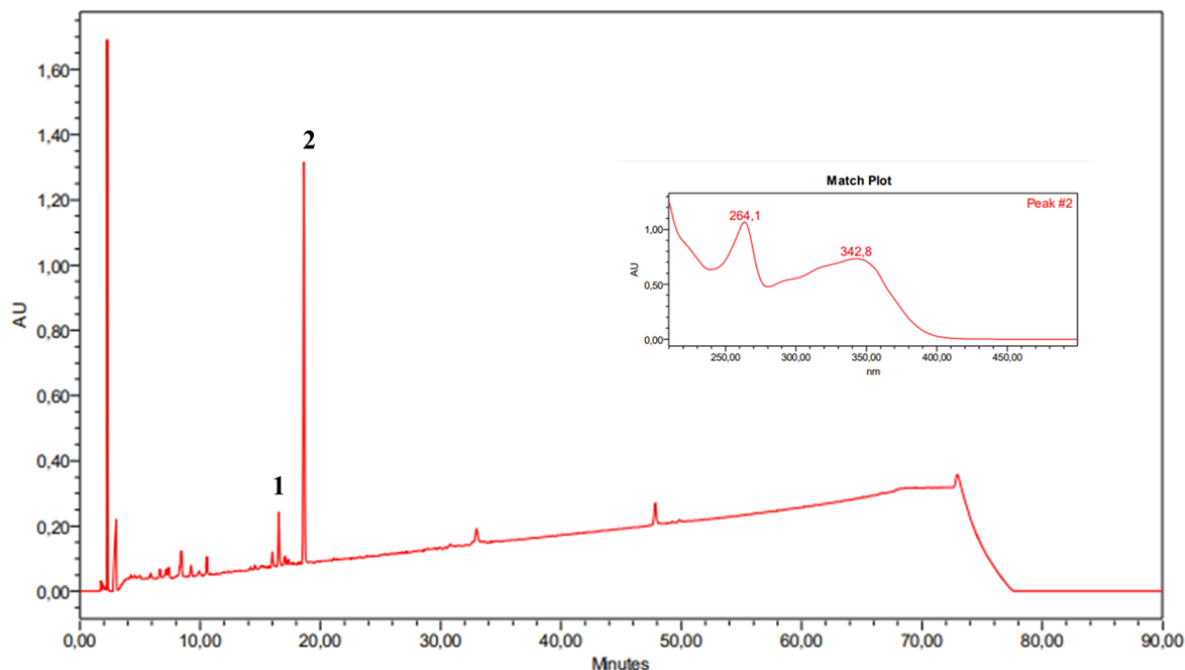
De forma geral, os resultados relatados na literatura a partir de estudos *in silico* corroboram o papel da quercitrina como molécula bioativa com potencial ação antiviral. As evidências obtidas por modelagem molecular, *docking* e simulações de dinâmica molecular indicam que a quercitrina apresenta elevada afinidade e estabilidade de interação com diferentes

alvos do SARS-CoV-2, destacando-se as proteínas 3CLpro e TMPRSS2, essenciais, respectivamente, para a replicação viral e para a entrada do vírus na célula hospedeira. Além disso, a quercitrina demonstrou capacidade de modular vias inflamatórias e oxidativas associadas à infecção viral, como as mediadas por IL-1 $\beta$ , IL-6 e NF- $\kappa$ B, sugerindo um mecanismo de ação multifatorial. Diante desse conjunto de evidências, é plausível inferir que a presença da quercitrina na fração EtOAc contribua de forma efetiva para o efeito antiviral observado nos ensaios biológicos em células calu-3 (item 5.4), atuando de maneira integrada sobre múltiplos alvos moleculares e processos biológicos relacionados à infecção pelo SARS-CoV-2. Ressalta-se que os ensaios experimentais envolvendo a quercitrina frente ao SARS-CoV-2 ainda estão em desenvolvimento, sendo esses resultados necessários para validar e aprofundar os efeitos antivirais previamente observados nos estudos *in silico* relatados na literatura.

#### 5.8.5 Isolamento e elucidação estrutural de AFZ32

A fração SFJ432 foi obtida a partir do refractionamento da fração EtOAc de *T. phaeocarpa* em coluna de Sephadex LH20. A análise por CCD de sílica gel desta fração exibiu uma mancha majoritária amarela, sugerindo a presença de flavonoide. Após revelação com anisaldeído sulfúrico, essa mancha manteve a coloração, reforçando tratar-se de flavonoide.

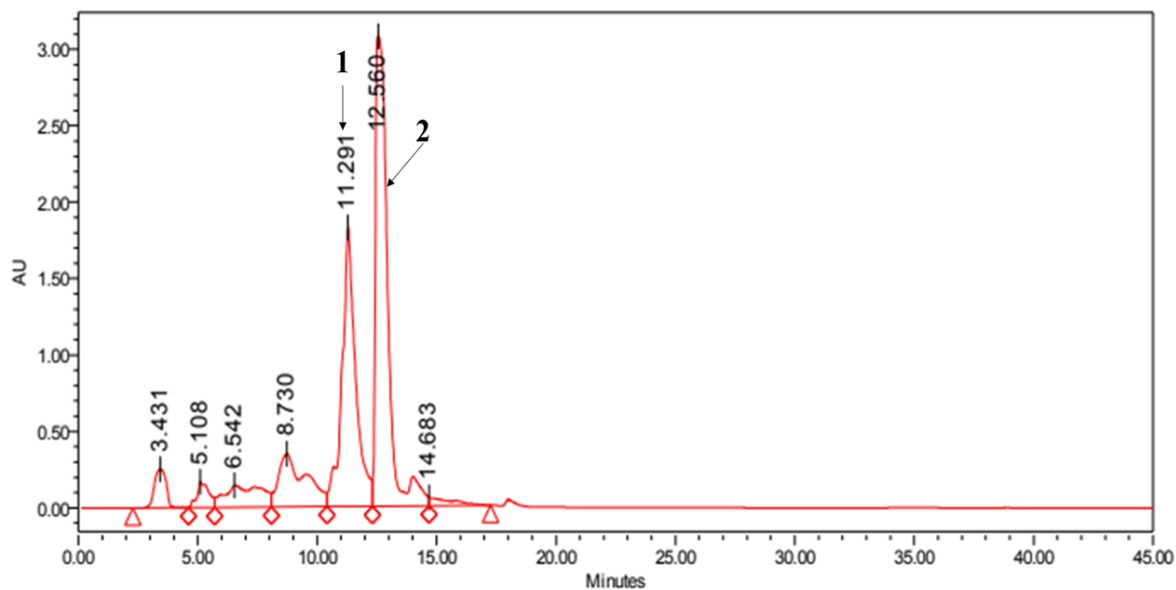
A fração SFJ432 foi analisada por HPLC-PDA, conforme descrito no item 4.23.2. O cromatograma resultante (**Figura 57**) revelou um pico majoritário com tempo de retenção de 18,62 minutos (pico 2), cujo espectro de absorção no UV exibiu  $\lambda_{\text{max}}$  em 264,1 e 342,8 nm, sugerindo tratar-se de glicosídeo de flavonol, conforme relatado por Islas-Garduño et al. (2023).



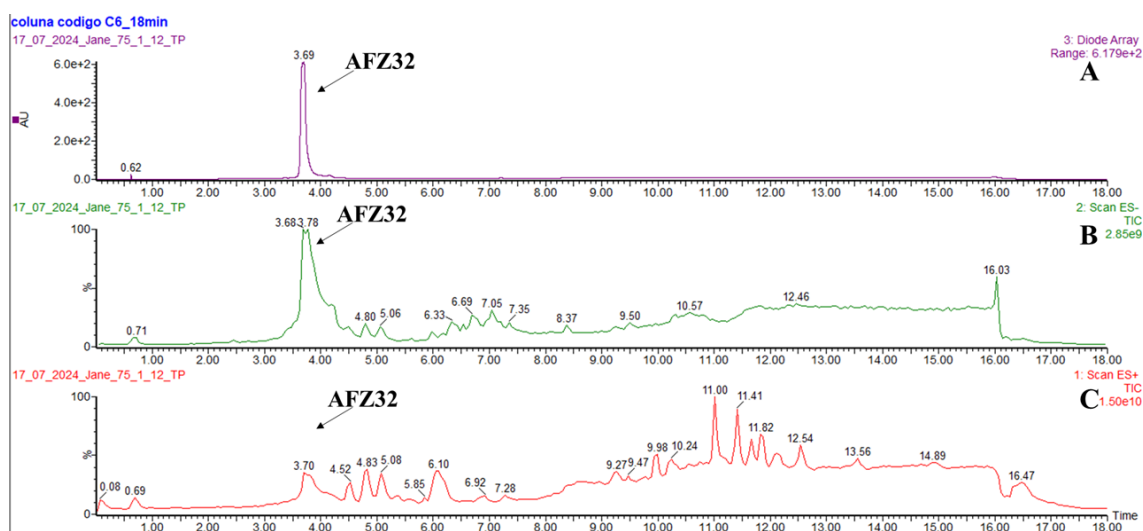
**Figura 57:** Cromatograma obtido por HPLC-PDA com detecção em maxplot para a fração SFJ432 oriunda do refractionamento da fração de EtOAc de *T. phaeocarpa*. O espectro no UV é referente ao pico 2 com  $t_r = 18,62$  min.

A purificação do pico 2 identificado na fração SFJ432 foi realizada por HPLC em escala preparativa, utilizando eluição em gradiente em corrida de 45 minutos. O perfil cromatográfico obtido por HPLC em escala preparativa para a fração SFJ432 está ilustrado na **Figura 58**. Após a coleta e combinação dos eluatos correspondentes ao pico 2 com tempo de retenção  $t_r = 12,56$  minutos, provenientes das 4 injeções, foi obtida uma massa total de 7 mg (item 4.23.). Vale ressaltar que todas as 4 injeções apresentaram alta reprodutibilidade, com perfis cromatográficos semelhantes.

Após a remoção do eluato correspondente ao pico 2, foi obtido como um sólido amarelo, o qual foi denominado de substância AFZ32. O espectro de absorção no UV (**Figura 59**), registrado online para AFZ32 pelo detector de arranjo de fotodiodos (PDA) acoplado ao sistema UPLC-PDA-ESI-MS/MS, apresentou  $\lambda_{m\acute{a}x}$  em 263 e 345 nm. Essas bandas são características de flavonoides do tipo flavonol, em que a absorção em torno de 260–270 nm (banda II) está associada às transições eletrônicas do anel benzênico A, enquanto a absorção mais intensa na região de 340–370 nm (banda I) é atribuída às transições do sistema conjugado do anel B. O perfil observado, portanto, evidencia a presença de um sistema aromático conjugado



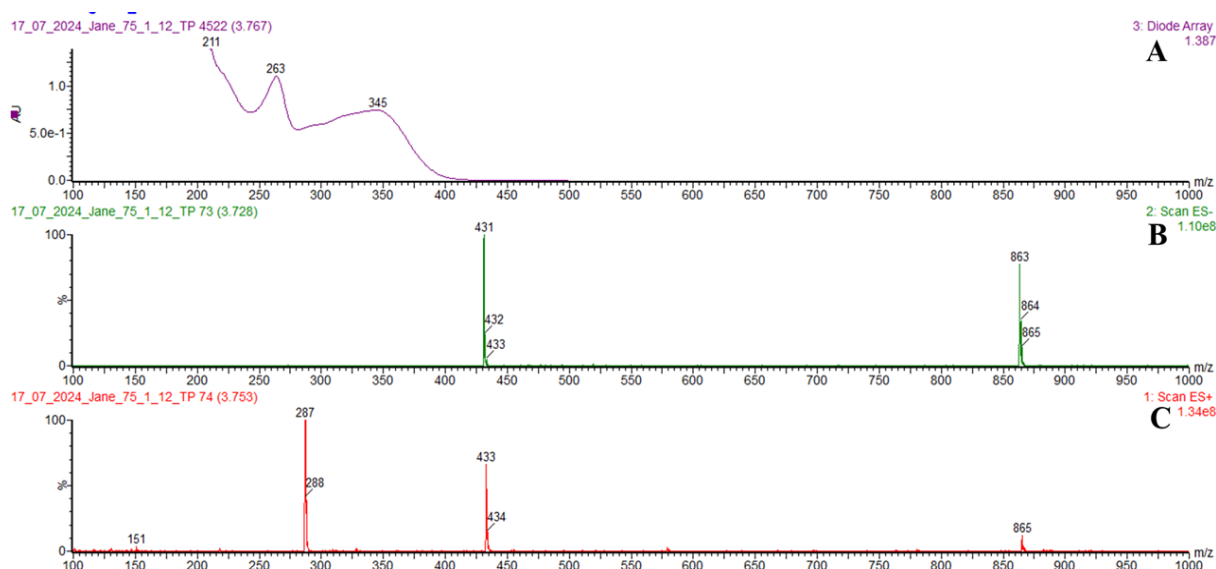
**Figura 58:** Cromatograma obtido por HPLC-UV em escala preparativa para a fração SFJ432 com detecção em 350 nm. Condições cromatográficas: vide Parte Experimental, item 4.23.2.



**Figura 59:** Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância AFZ32 com detecção no UV (roxo) e por MS nos modos de ionização positivo (ESI+) (vermelho) e negativo (ESI-) (verde). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.23.2.

O cromatograma obtido no UPLC-PDA-ESI-MS/MS (**Figura 60**) indicou que a substância AFZ32 possui tempo de retenção de 3,69 minutos. Nos espectros de massa, foram observados íons com  $m/z$  431 Da no modo negativo de ionização e 433 Da no modo positivo

de ionização, indicando que a massa molar da substância é de 432 Da (**Figura 60**). Além disso, foram detectados sinais de dímeros em  $m/z$  863  $[2M-H]^-$  e  $m/z$  865  $[2M+H]^+$ , confirmando a massa molecular de aproximadamente 432 Da. Também se observou um fragmento em  $m/z$  287 no modo de ionização positivo, correspondente à aglicona do flavonoide, após a perda do monossacarídeo.

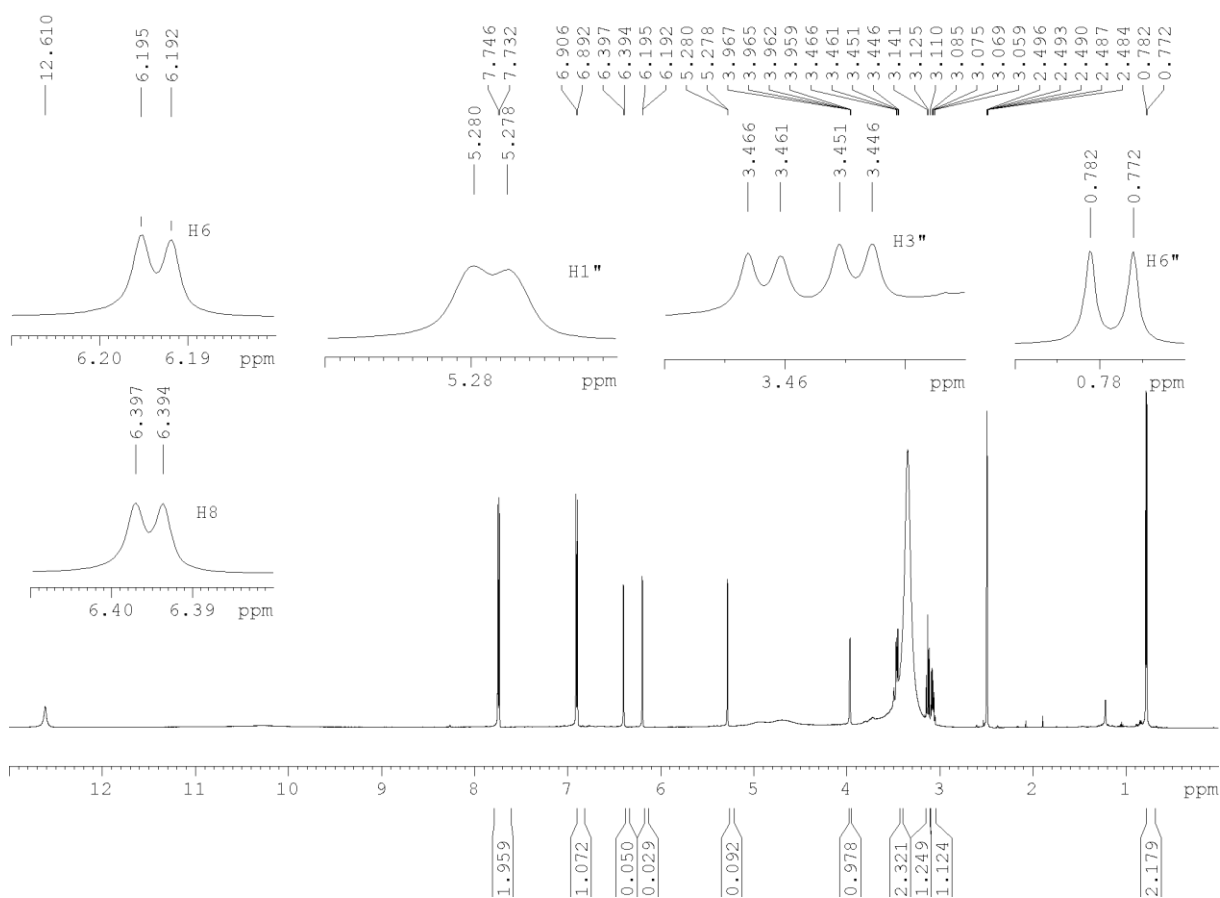


**Figura 60:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a substância AFZ32 obtida do refração de EtOAc de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV e por MS nos modos de ionização (b) negativo (ESI-) e (c) positivo (ESI+).

Para a elucidação estrutural da substância AFZ32, foram obtidos espectros de RMN mono e bidimensionais. No espectro de RMN de  $^1H$  (**Figura 61**), identificaram-se doze sinais de ressonância. Os dupletos centrados em 6,19 ppm (d,  $J=1,92$  Hz) e em 6,39 ppm (d,  $J=1,92$  Hz) foram atribuídos aos prótons H-6 e H-8 do anel A. Adicionalmente, observaram-se dois dupletos centrados em 7,73 ppm (d,  $J=8,7$  Hz) e 6,89 ppm (d,  $J=8,7$  Hz), correspondentes aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5', respectivamente (SUEDEE et al., 2013). A análise do espectro de RMN de  $^1H$  (**Figura 61**) revelou a presença de um duplete centrado em 5,27 ppm ( $J=1,2$  Hz), atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1'') da unidade de açúcar. O baixo valor da constante de acoplamento escalar é compatível com a estereoquímica  $\alpha$  da ligação glicosídica, embora não permita, isoladamente, definir a identidade do açúcar. No espectro de  $^{13}C$ , observou-se o sinal do carbono anomérico (C-1'') em 103,5 ppm, está dentro da faixa esperada para carbonos anoméricos glicosilados. Além disso, foi identificado um duplete centrado em 0,78 ppm (d,  $J=6,0$  Hz) com integral correspondente a três hidrogênios, característico de um

grupo metila. Esse padrão, associado aos deslocamentos químicos observados, que estão em concordância com dados descritos por Lee et al. (2014), sustenta a atribuição da unidade monossacarídica como sendo  $\alpha$ -L-ranopiranosídeo (**Tabela 21**).

**Figura 61:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  obtido para a substância AFZ32 e expansões (DMSO- $d_6$ , 600 MHz).

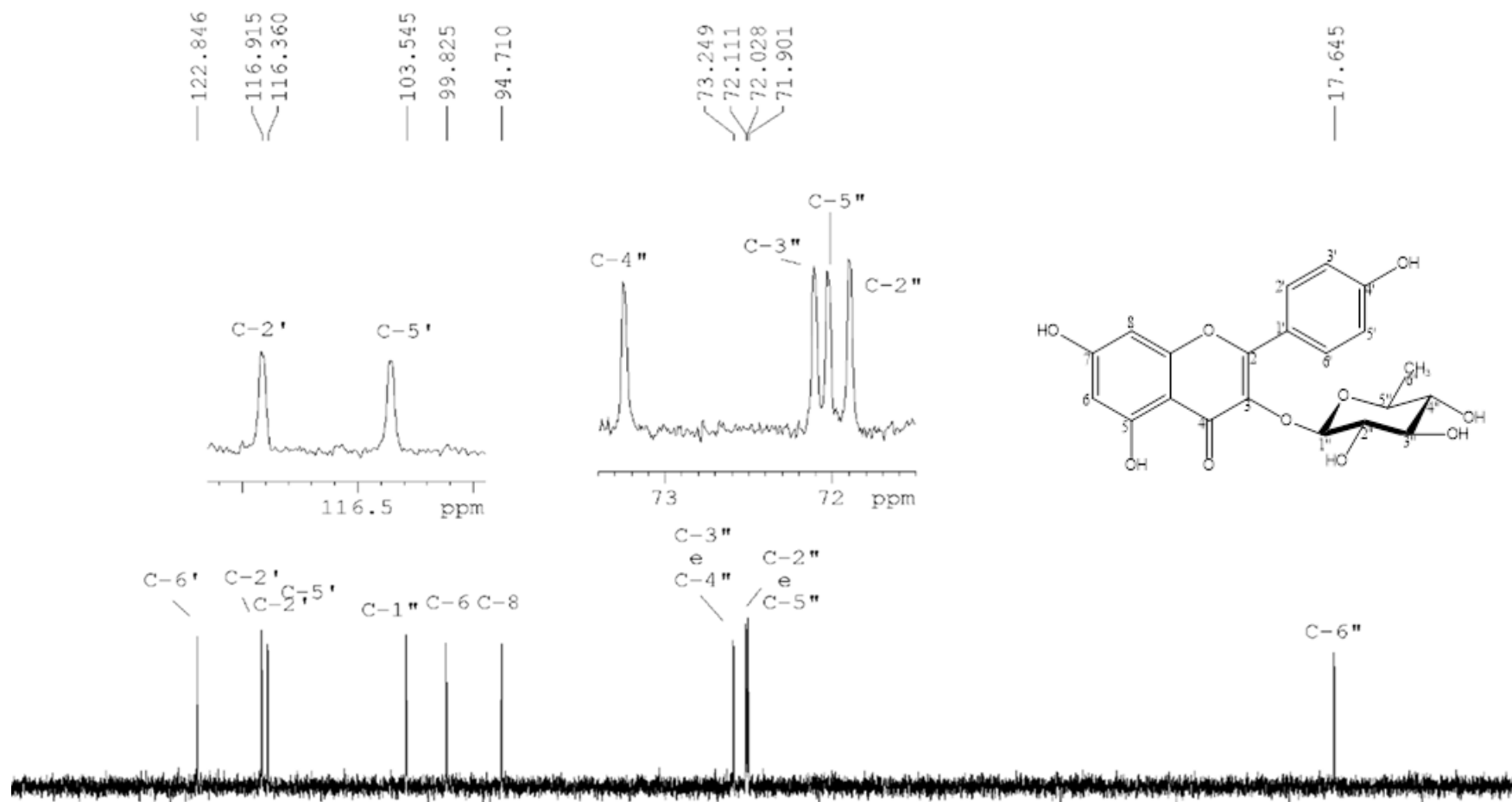


**Tabela 21:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para a substância AFZ32 (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) e dados da literatura relatados para o canferol-3- $O$ - $\alpha$ -L-ramnosídeo (afzelina) ( $^a$ DMSO- $d_6$ ;  $^b$ acetona  $d_6$ ).

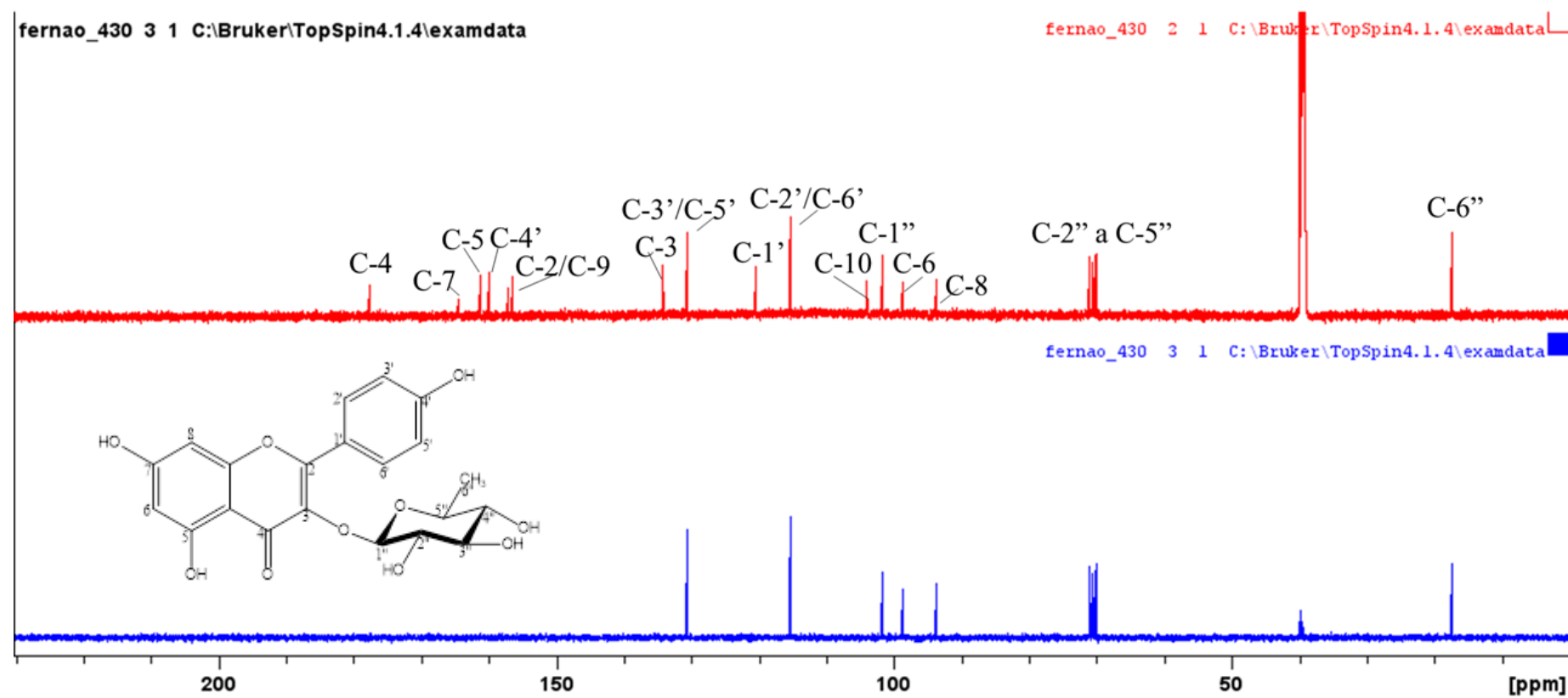
$^1\text{H}$	AFZ32 $\delta$ (ppm) $J$ (Hz)	$^a$ Afzelina (Lee et al., 2014) (400 MHz)	$^b$ Afzelina (Romero-Benavides et al., 2023) (500 MHz) $^c$
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	6,19 (d, $J$ 1,9 Hz)	6,19 (d, $J$ 2,4 Hz)	6,26 (d, $J$ 2,0 Hz)
7	-	-	-
8	6,39 (d, $J$ 1,9 Hz)	6,36 (d, $J$ 2,2 Hz)	6,47 (d, $J$ 2,0 Hz)
9	-	-	-
10	-	-	-
1'	-	-	-
2'	7,73 (d, $J$ 8,8 Hz)	7,76 (d, $J$ 8,6 Hz)	7,86 (d, 8,5 Hz)
3'	6,89 (d, $J$ 8,8 Hz)	6,93 (d, $J$ 8,8 Hz)	7,01 (d, 9,0 Hz)
4'	-	-	-
5'	6,89 (d, $J$ 8,8 Hz)	6,93 (d, $J$ 8,8 Hz)	7,02 (d, $J$ 9,0 Hz)
6'	7,73 (d, $J$ 8,8 Hz)	7,76 (d, $J$ 8,6 Hz)	7,84 (d, $J$ 8,5 Hz)
1''	5,27 (d, $J$ 1,2 Hz)	5,36 (1H, d, $J$ 2,2 Hz)	5,54 (d, $J$ 1,5 Hz)
2''	3,91 (m)	4,21 (dd, $J$ 1,7 e 3,42 Hz)	4,21 (m)
3''	3,45 (dd, $J$ 3,24 e 9,06 Hz)	3,71 (m)	3,67 (m)
4''	3,03 (sobrepuesto)	3,60 (m)	3,3 (m)
5''	3,08 (m)	3,47 (m)	3,32 (m)
6''	0,78 (d, $J$ 6,06 Hz)	0,91 (d, $J$ 5,6 Hz)	0,89 (d, $J$ 6,0 Hz)

Já no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 62**) foram identificados 19 sinais de ressonância, número compatível com um flavonoide monoglicosilado. Essa proposta é sustentada pela presença de um sinal em 101,76 ppm, típico de carbono anomérico (C-1''), bem como pelo sinal em 17,4 ppm, atribuído ao carbono C-6'' de um grupo metila, característico da ramnose. Esses sinais indicam a existência de uma unidade de açúcar ligada ao núcleo flavonoídico conforme dados relatados por After et al. (2022). A análise do subespectro DEPT-135 auxiliou na identificação dos carbonos metínicos e do carbono metílico presentes na estrutura da substância. Identificou-se, também, o sinal do carbono carbonílico em 177,6 ppm, evidenciado por sua ausência no DEPT-135, característica esperada para carbonos não hidrogenados (**Figura 63**). Além disso, foram detectados três sinais entre 159,9 e 164,4 ppm, correspondentes a carbonos não hidrogenados ligados a hidroxilas fenólicas, que também não aparecem no DEPT-135. No total, a ausência de nove sinais de carbonos não hidrogenados reforça a característica estrutural de um esqueleto flavonoídico típico, composto pelas unidades C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (KUMAR; PANDEY, 2013; CARDOSO et al., 2013).

Adicionalmente, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 62**) foram detectados dois sinais em 98,7 ppm e 93,7 ppm, que foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-8 do anel A, respectivamente (CARDOSO et al., 2013). Esses valores de deslocamentos químicos indicam que os carbonos estão ligados a átomos ou grupos que reduzem a densidade eletrônica, como átomos de oxigênio, indicando a substituição com grupos hidroxila. Além disso, foram observados os sinais em 136,48 ppm e 158,72 ppm, atribuídos aos carbonos olefínicos C-3 e C-2, respectivamente.



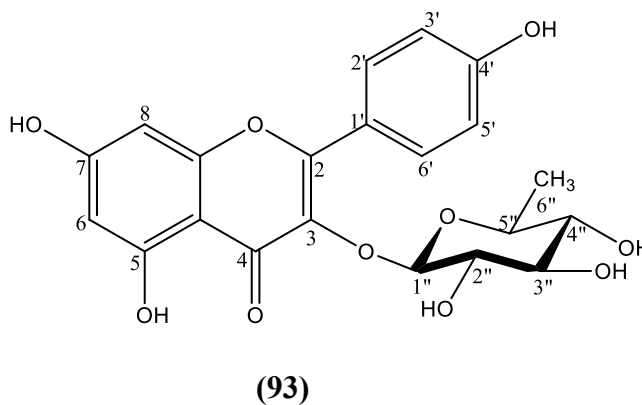
**Figura 62:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  obtido para a substância AFZ32 (DMSO- $d_6$ , 150 MHz).

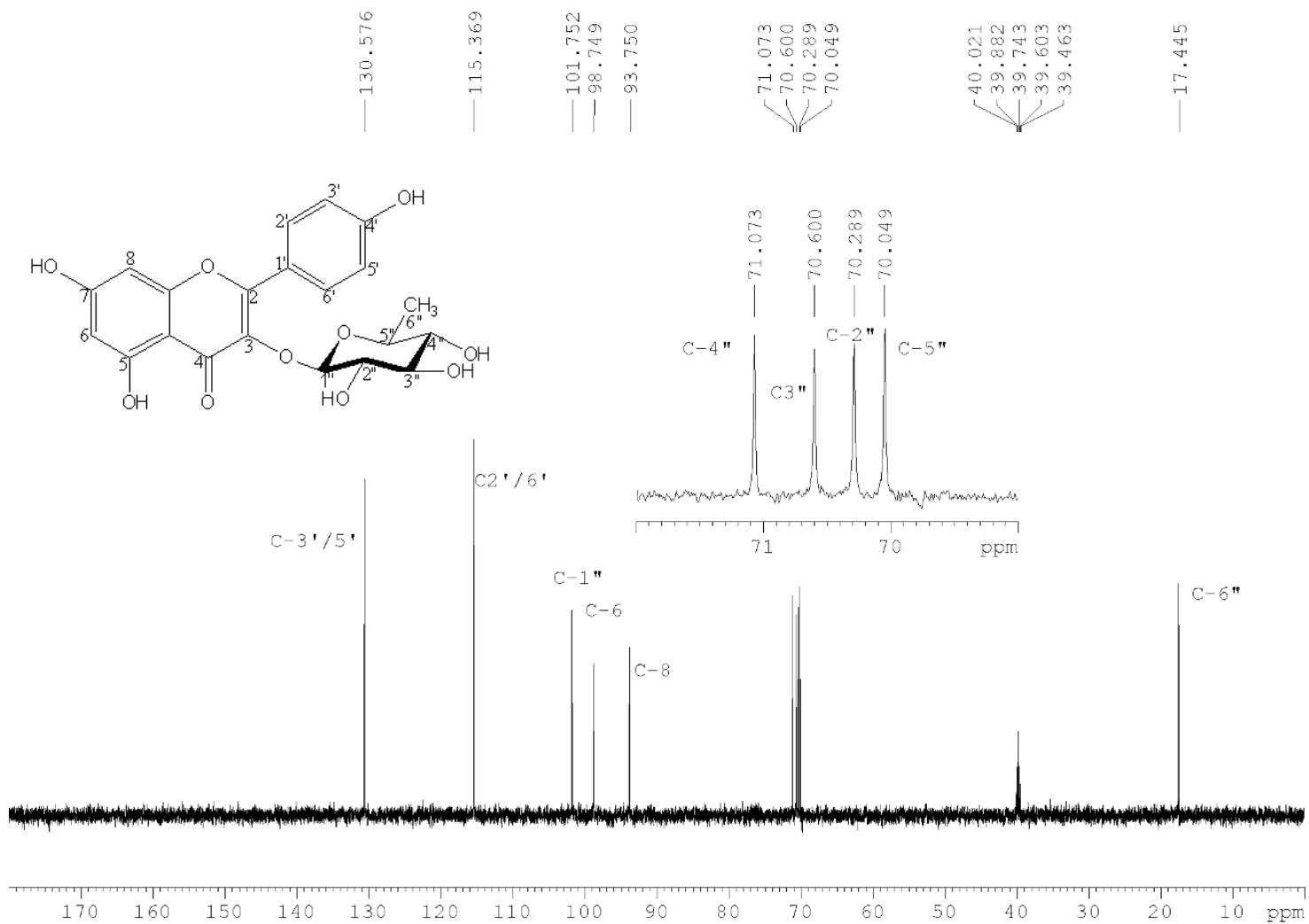


**Figura 63:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (a) e subspectro DEPT-135 (b) obtidos para a substância AFZ32, com indicação da atribuição do sinal de ressonância do carbono carbonílico e carbono com hidroxilas fenólicas (150 MHz, DMSO).

Por sua vez, a análise do subespectro DEPT-135 (**Figura 64**) na região entre 17,4 e 130,5 ppm revelou a presença de dez sinais de ressonância. Os sinais entre 70,0 e 71,8 ppm e o sinal em 101,7 ppm foram atribuídos a carbonos oximetínicos, típicos da estrutura de açúcares. Adicionalmente, foi identificado um sinal em 17,4 ppm, associado ao carbono metílico C-6'' da unidade ramnosídica, conforme dados relatados na literatura por Suedee et al. (2013).

Essa interpretação espectral encontra suporte adicional ao se comparar os valores de deslocamento químico obtidos (**Tabela 22**), que apresentam forte concordância com aqueles descritos anteriormente para o canferol-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (afzelina) (**93**) (ISLAS-GARDUÑO et al., 2023).





**Figura 64:** Expansões do subspectro DEPT-135 obtidos para substância AFZ32 (DMSO-d<sub>6</sub>; 150 MHz).

**Tabela 22:** Atribuição dos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância AFZ32 (DMSO- $d_6$ , 150 MHz) e comparação com dados da literatura para a afzelina (DMSO- $d_6$ ,  $^a$ 75 MHz e  $^b$ 100 MHz).

$^{13}\text{C}$	Atribuições dos sinais de $^{13}\text{C}$	AFZ32 $\delta$ (ppm)	Afelina ( $^a$ Cardoso et al., 2013) $\delta$ (ppm)	Afelina ( $^b$ Lee et al., 2014) $\delta$ (ppm)
1		-	-	-
2	C	157,1	157,8	158,62
3	C	134,1	134,0	136,15
4	C=O	177,6	177,6	179,35
5	COH	161,2	161,9	163,2
6	CH	98,7	98,5	100,06
7	COH	164,4	164,1	166,6
8	CH	93,7	93,5	94,92
9	C	156,5	156,8	159,24
10	C	104,0	103,9	105,73
1'	C	120,4	121,8	122,62
2'	CH	130,5	130,3	131,9
3'	CH	115,3	115,3	116,54
4'	COH	159,9	161,3	161,63
5'	CH	115,3	115,3	116,54
6'	CH	130,5	130,3	131,9
1''	CH	101,7	101,9	103,5
2''	CH	70,2	70,4	72,09
3''	CH	70,6	70,6	72,04
4''	CH	71,0	70,8	73,17
5''	CH	70,0	69,8	71,92
6''	CH <sub>3</sub>	17,4	16,6	17,66

As atribuições dos sinais de ressonância dos hidrogênios da unidade de açúcar foram realizadas por meio de correlações homonucleares observadas no espectro COSY (**Figura 65**). Os deslocamentos químicos dos prótons analisados apresentaram correspondência com os valores descritos por Lee et al. (2014). O acoplamento vicinal ( $^3J_{aa}$ ) entre H-3'' e H-4'' foi claramente identificado, enquanto o hidrogênio H-6'' destacou-se como o único com integral correspondente a três hidrogênios, confirmando seu acoplamento com H-5'' ( $^3J$ ), permitindo a atribuição dos sinais.

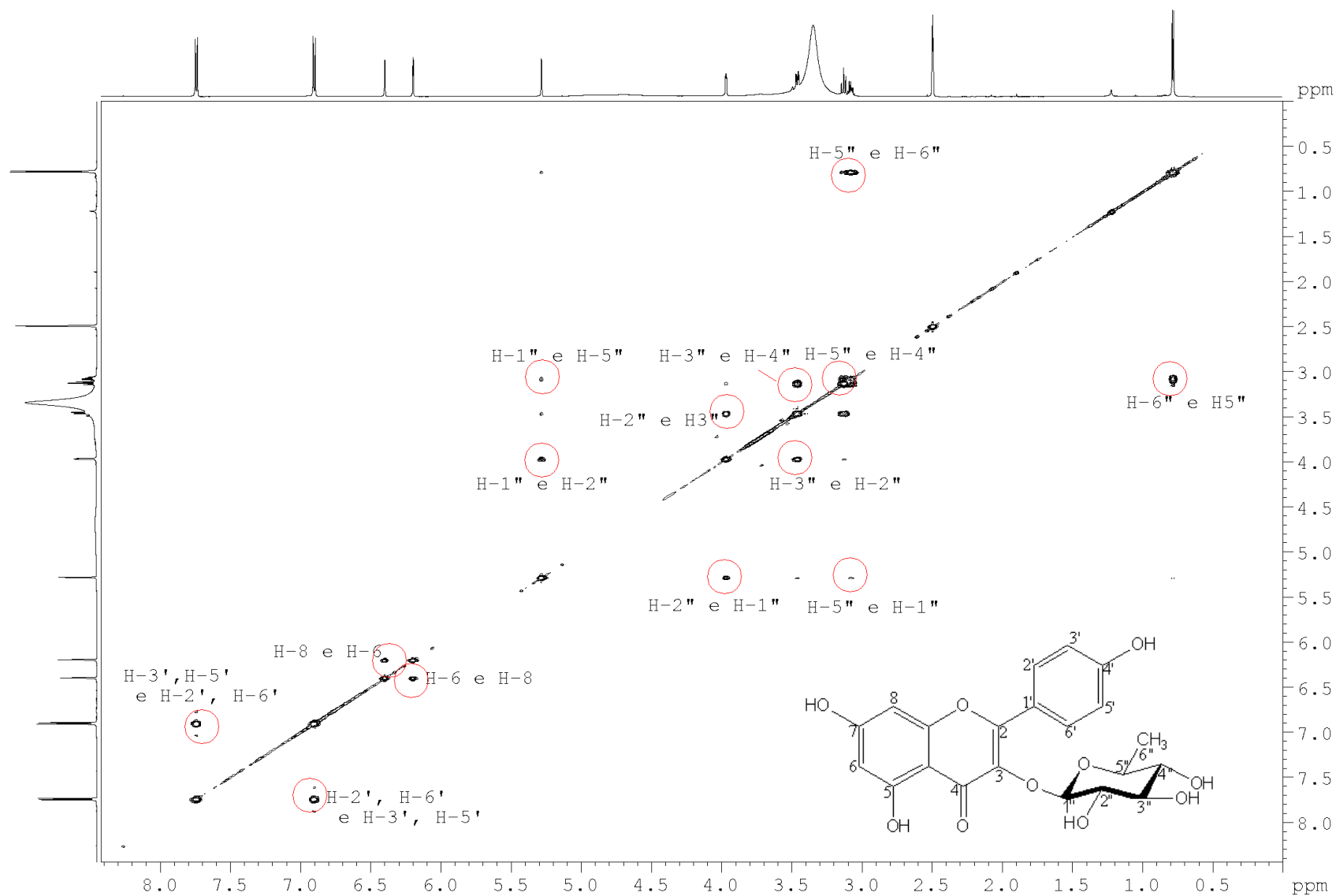
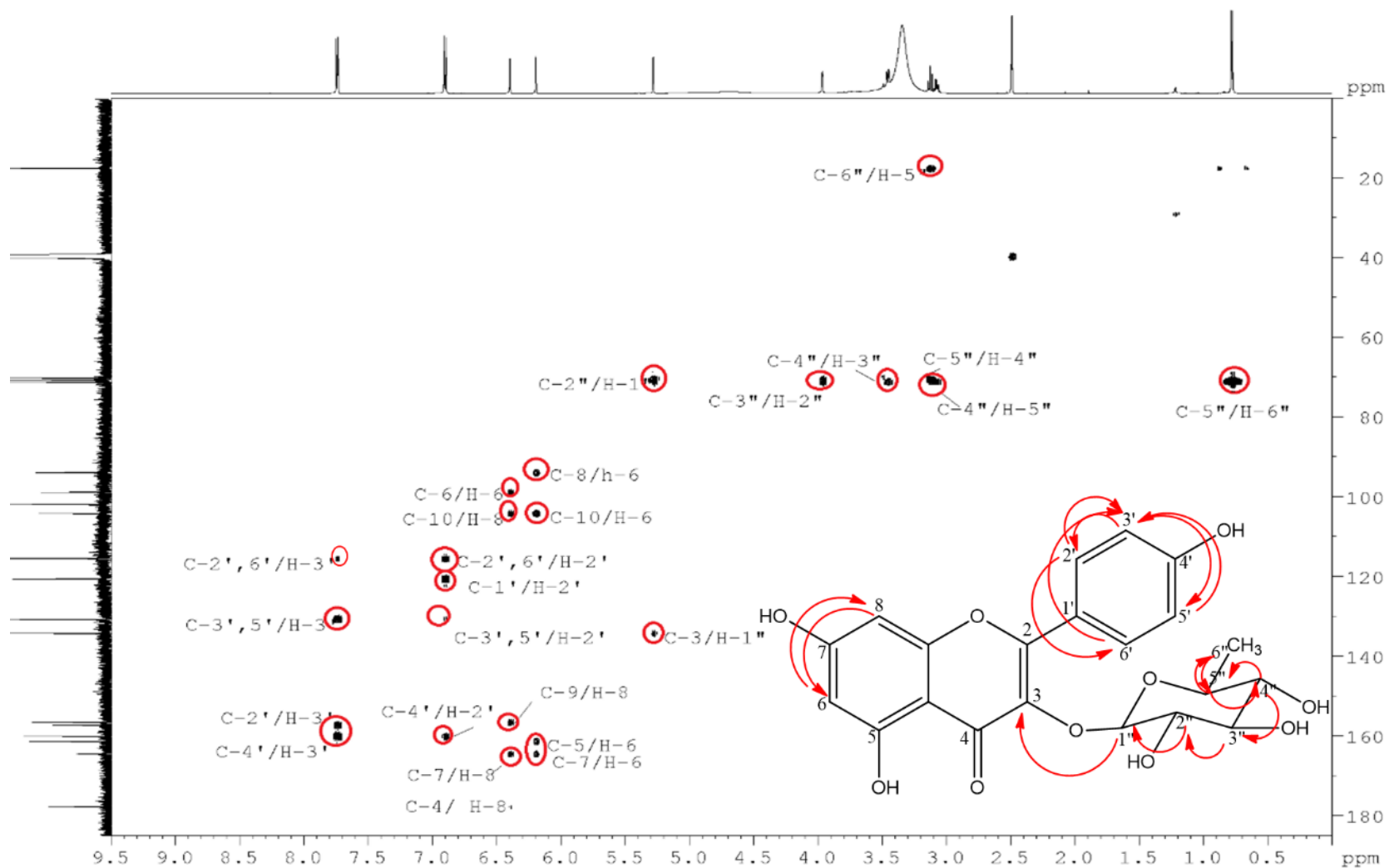


Figura 65: Mapa de correlação mononuclear COSY obtido para a substância AFZ32 (DMSO-d<sub>6</sub>; 600 MHz.).

Os experimentos de HMBC foram fundamentais para confirmar a atribuição de alguns sinais de ressonância de AFZ32 e confirmar sua identificação como sendo a afzelina. Assim, o mapa de correlações HMBC (**Figura 66**) indicou mancha de correlação entre o hidrogênio anomérico H-1" em 5,23 ppm e o carbono C-3 em  $\delta$  134,1 ppm indicando a ligação da unidade ramnosídica no carbono C-3 da aglicona, conforme descrito por Lee et al. (2014).

Adicionalmente, observa-se mancha de correlação entre o sinal de H-6" (0,78 ppm) e os carbonos C-5" (70,05 ppm) e C-4" (71,8 ppm), possibilitando atribuir inequivocamente o carbono metílico (CH<sub>3</sub>) da ramnose. Os demais hidrogênios da unidade de açúcar também foram inequivocamente atribuídos através de um conjunto de correlações observadas nos experimentos de HMBC e COSY. As seguintes correlações (<sup>2</sup>J a e <sup>4</sup>J) foram identificadas no mapa de contornos HMBC: H-1" com C-3 e C-2"; H-2" com C-1" e C-3"; H-3" com C-2" e C-4"; H-4" com C-3" e C-5"; e H-5" com C-4" e C-6". Adicionalmente, as correlações vicinais no experimento COSY (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) confirmaram a conectividade sequencial entre os hidrogênios H-1"/H-2"/H-3"/H-4"/H-5". Este conjunto completo de dados define a sequência *spin-spin* de O-C1"-C2"-C3"-C4"-C5"-C6" confirmando as atribuições estruturais do monossacarídeo, que está em concordância com os valores de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento escalar descritos para a unidade de  $\alpha$ -L-ramnose na afzelina (LEE et al., 2014).

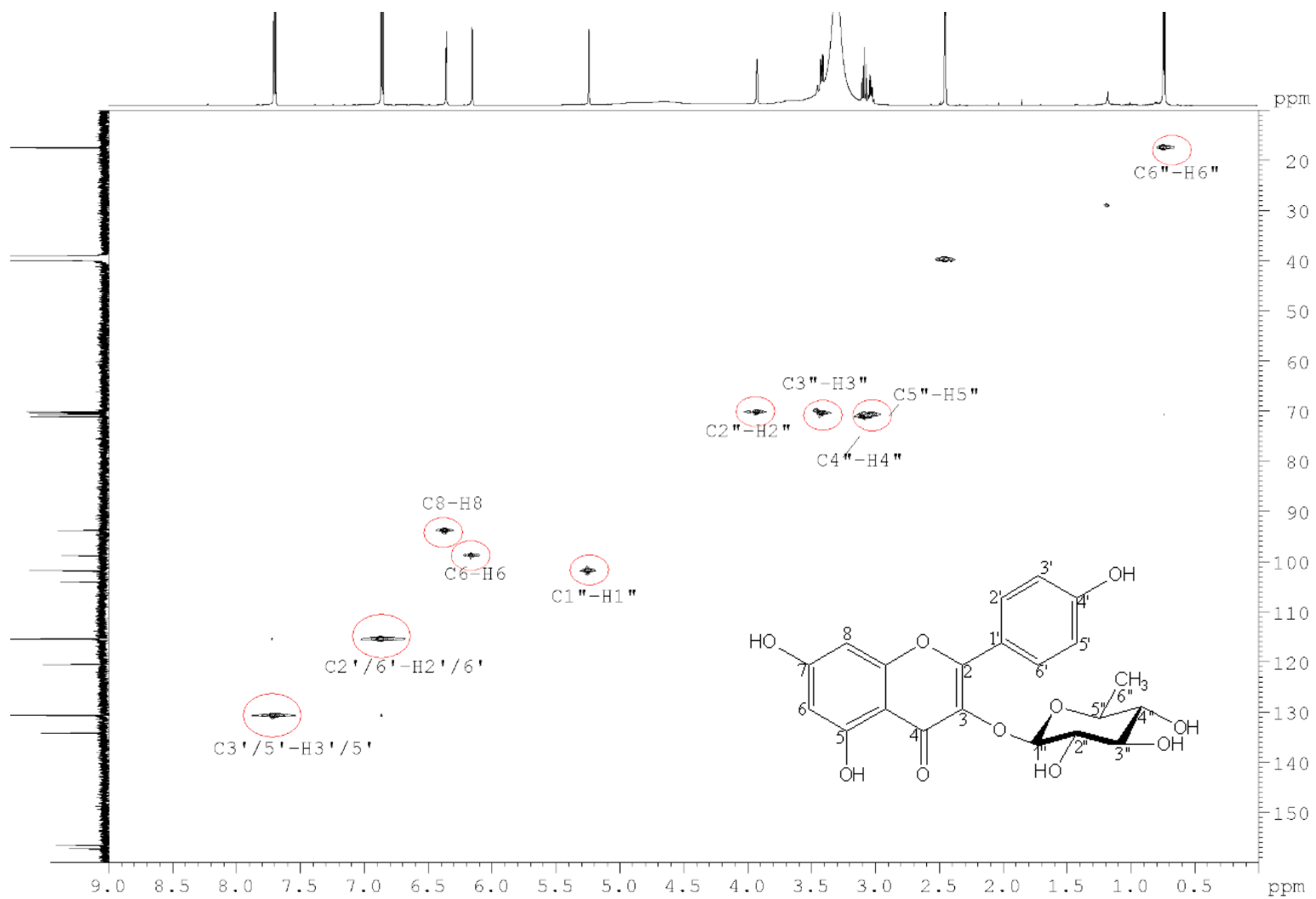


**Figura 66:** Mapa de contorno heteronuclear HMBC demonstrando as correlações entre os sinais de ressonância de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  via  $^3J$  para a substância AFZ32 (600 MHz para  $^1\text{H}$  e 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ; DMSO).

Para concluir a identificação estrutural de AFZ32, foram realizados experimentos de HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*). Esse método de espectroscopia de RMN é amplamente utilizado para identificar correlações entre átomos de hidrogênio e os carbonos diretamente ligados, por meio de acoplamentos escalares de uma única ligação  $^1J$  (IGGO et al., 2008). O mapa de contorno gerado por HMQC (**Figura 67**) permitiu correlacionar diretamente os sinais de hidrogênio aos respectivos carbonos a que estão ligados, contribuindo significativamente para a determinação precisa da estrutura química de AFZ32 como sendo a afzelina.

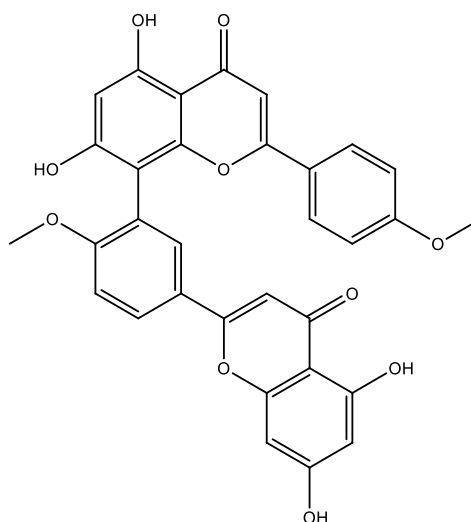
A análise do espectro de HMQC foi fundamental para a atribuição inequívoca dos sinais de hidrogênio e carbono da molécula. No anel A, as correlações diretas entre H-6 e C-6 (6,18 e 98,7 ppm) e entre H-8 e C-8 (6,35 e 93,9 ppm) foram claramente observadas. No anel B, os sinais dos pares de hidrogênios magneticamente equivalentes foram confirmados pelas correlações entre H-2'/H-6' e C-2'/C-6' (6,89 e 115,3 ppm) e entre H-3'/H-5' e C-3'/C-5' (7,73 e 130,5 ppm). Para a unidade de  $\alpha$ -L-ramnose, todas as correlações foram identificadas, incluindo H-1''/C-1'' (5,27 e 101,7 ppm), H-2''/C-2'' (3,45 e 70,6 ppm), H-3''/C-3'' (3,45 e 70,6 ppm), H-4''/C-4'' (3,08 e 71,0 ppm), H-5''/C-5'' (3,12 e 70,5 ppm) e H-6''/C-6'' (0,78 e 17,45 ppm). Todos os deslocamentos químicos observados demonstram concordância com os dados previamente relatados por Akter et al. (2022), comprovando a identificação da substância como afzelina.

Sendo assim, este trabalho representa o primeiro relato de isolamento e caracterização do glicosídeo de flavonol afzelina (canferol-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo) em *T. phaeocarpa*. Estudos fitoquímicos anteriores com a espécie *T. phaeocarpa* relataram a ocorrência de outros glicosídeos de flavonoides (GOMES et al., 2021), mas a afzelina não havia sido previamente identificada como um constituinte químico da espécie. Todavia, a ocorrência da afzelina já foi relatada em diferentes espécies e gêneros (YANG et al., 2025; MERINGOLO et al., 2022).



**Figura 67:** Mapa de contorno heteronuclear HMQC obtido para a substância AFZ32 (DMSO-d<sub>6</sub>; 600 MHz para <sup>1</sup>H e 150 MHz para <sup>13</sup>C).

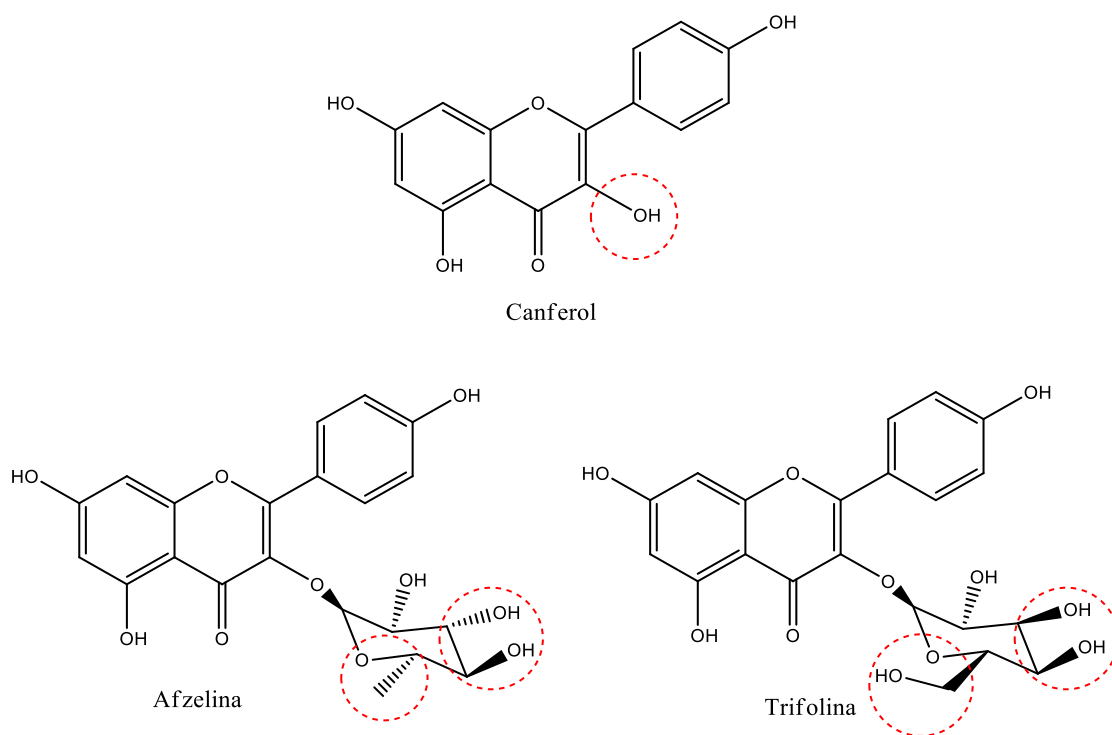
Sua potencial atividade biológica foi relatada frente ao SARS-CoV-2 em ensaios *in silico*. Raj et al. (2022) realizaram estudos de *docking* molecular e de dinâmica molecular da afzelina com a proteína Mpro do SARS-CoV-2. No estudo de *docking* a afzelina apresentou afinidades de  $-9,02$  kcal/mol (VINA) e  $-11,36$  kcal/mol (AutoDock), interagindo com His41, Met165, Glu166, Asp187 e Gln189 via dez ligações  $\pi$ - $\pi$  e uma ligação de hidrogênio, indicando potencial de ligação ao sítio ativo. Já os estudos de dinâmica molecular de 100 nanosegundos mostraram variação de energias de  $-100$  a  $300$  kcal/mol, sugerindo menor estabilidade do complexo do sítio ativo, como também, flutuações maiores da espinha dorsal, ou seja, movimentos mais amplos da cadeia principal da Mpro, refletindo maior flexibilidade e menor estabilidade do complexo em comparação à isoginkgetina (**94**), biflavonoide utilizado também avaliado no estudo de *docking* (RAJ et al., 2022).



(94)

Estudos de *docking* molecular realizados por Makati et al. (2022) demonstraram que a afzelina apresenta forte afinidade de interação com múltiplos alvos proteicos do SARS-CoV-2, especialmente com a proteína Mpro, para a qual apresentou energias de interação mais negativas entre os três compostos testados (afzelina, trifolina e canferol): (**Figura 68**)  $-346,70$  kcal/mol (cadeias polipeptídicas da proteína alvo AC),  $-347,65$  kcal/mol (cadeia BD) e  $-42,77$  kcal/mol (cadeias polipeptídicas da proteína alvo ABCD). A análise detalhada das interações revelou que a afzelina forma uma rede complexa de ligações, incluindo ligações de hidrogênio com Lys5 e Trp207, ligações de van der Waals em Phe3, Arg4, Arg131, Gly138, Leu282, Gly283, Ser284, Leu286, Glu288, Asp289 e Phe291, além de ligações Pi-Sigma e hidrogênio-carbono. Embora algumas interações desfavoráveis tenham sido observadas (como Pi-Alquil

em Leu283 e Lys5), a predominância de interações estáveis sugere que a afzelina se liga de forma eficiente ao sítio ativo da 3CLpro. Em outros alvos proteicos, a energia de interação mais negativa variou conforme o composto: para RdRp Nsp7\_Nsp8, a trifolina apresentou maior afinidade ( $-310,87$  kcal/mol), enquanto para PLpro e Nsp1, a afzelina novamente mostrou interações mais favoráveis ( $-190,23$  e  $-286,89$  kcal/mol, respectivamente). A proteína Nsp3 e o receptor ECA2 apresentaram maior afinidade pela trifolina ( $-334,97$  e  $-307,96$  kcal/mol), evidenciando que diferentes flavonoides podem apresentar seletividade distinta conforme a proteína alvo (MAKATI et al., 2022). Vale destacar que a trifolina e a afzelina são *O*-glicosídeos do canferol em C3, sendo a porção monossacarídica da primeira a galctose e da segunda a ramnose. A variação na natureza do açúcar pode alterar a polaridade, a flexibilidade e a capacidade de formar ligações de hidrogênio do composto, influenciando sua afinidade e seletividade pelos diferentes alvos proteicos.



**Figura 68:** Comparação estrutural entre a canferol, afzelina e a trifolina, diferenças entre os açúcares ligados (ramnose na afzelina e galactose na trifolina) e estereoquímica das hidroxilas em C-3'' e C-4''.

Além da potencial atividade antiviral observada frente ao SARS-CoV-2, um estudo recente de Nopkuesuk et al. (2025) demonstrou que a afzelina também apresenta efeito contra o vírus da influenza A. Os resultados de *docking* molecular indicaram que a afzelina interage de maneira robusta com resíduos críticos do sítio ativo da neuraminidase (NA), formando nove

ligações de hidrogênio com Glu119, Ile149, Arg152, Glu228, Arg225, Glu278 e Arg293, além de múltiplas interações hidrofóbicas, incluindo  $\pi$ -cátion,  $\pi$ -alquil e alquil-alquil, com Lys150, Arg152, Arg293 e Arg368. Essas interações sugerem um mecanismo de inibição capaz de bloquear a atividade catalítica da neuraminidase, essencial para a liberação viral e propagação para células adjacentes. Além disso, a afzelina mostrou forte afinidade pelo domínio de ligação cap-2 da RNA polimerase viral (PB2), formando cinco ligações rígidas de hidrogênio e diversas interações  $\pi$  e hidrofóbicas com resíduos altamente conservados, incluindo Lys339, Arg366, His357, Phe323, Phe363 e Phe404 (NOPKUESUK et al., 2025).

Considerando os dados disponíveis na literatura, obtidos a partir de estudos *in silico*, infere-se que a afzelina apresenta propriedades estruturais e eletrônicas que favorecem sua interação com proteínas virais envolvidas em etapas críticas do ciclo replicativo do SARS-CoV-2. Nesse contexto, a contribuição da afzelina para a atividade antiviral observada na fração EtOAc de *T. phaeocarpa* pode estar associada à sua capacidade de interagir de com proteínas virais envolvidas na replicação e maturação do SARS-CoV-2, sustentando a hipótese de que este flavonol glicosilado atue como um dos constituintes bioativos responsáveis pelo efeito antiviral da fração EtOAc, ensaiadas em células calu-3 frente ao SARS-CoV-2 e os ensaios *in silicos* relatados na literatura.

Ressalta-se que os ensaios experimentais envolvendo a afzelina frente ao SARS-CoV-2 ainda estão em desenvolvimento, sendo esses resultados necessários para validar e aprofundar os efeitos antivirais previamente observados nos estudos *in silico* relatados na literatura.

## 6. CONCLUSÃO

A abordagem quimiosistemática adotada mostrou-se eficaz para a identificação de extratos vegetais com potencial antiviral frente ao betacoronavírus MHV-3, um modelo biológico relevante para a avaliação de potenciais agentes anti-SARS-CoV-2. A triagem resultou na identificação dos extratos de *Baccharis grandmucromata* e *Terminalia phaeocarpa* com atividade antiviral. O fracionamento biomonitorado do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* indicou que os constituintes antivirais estão distribuídos em todas as frações obtidas (*n*-hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica). No entanto, observou-se maior inibição da replicação viral nas frações *n*-hexânica e diclorometânica, sugerindo que metabólitos de menor polaridade desempenham papel particularmente relevante na atividade observada.

A caracterização química da fração *n*-hexânica por GC-MS permitiu a identificação de hidrocarbonetos, um triterpeno e um fitoesterol. Adicionalmente, análises por RMN de dois sólidos obtidos a partir do refração dessa fração possibilitaram a identificação de  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -amirina, ambos descritos pela primeira vez em *T. phaeocarpa*.

Os extratos de *B. grandmucromata* e *T. phaeocarpa*, bem como as frações derivadas deste último, foram avaliados em células humanas Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2 e promoveram redução do título viral, corroborando o efeito anti-betacoronavírus observado frente ao MHV-3. A fração em acetato de etila foi a mais ativa contra o SARS-CoV-2, e seu estudo fitoquímico resultou no isolamento e identificação de dois flavonoides monoglicosilados, quercitrina (quercetina-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo) e afzelina (canferol-3-*O*- $\alpha$ -L-ramnosídeo), cuja ocorrência na espécie é inédita.

## REFERÊNCIAS

ABUBAKAR, Murtala Bello; USMAN, Dawoud; BATIHA, Gaber El-Saber; CRUZ-MARTINS, Natália; MALAMI, Ibrahim; IBRAHIM, Kasimu Ghandi; ABUBAKAR, Bilyaminu; BELLO, Muhammad Bashir; MUHAMMAD, Aliyu; GAN, Siew Hua. Natural Products Modulating Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) as Potential COVID-19 Therapies. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 12, p. 1-19, 3 maio 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2021.629935>.

ADAMI, Cecilia; POOLEY, Joan; GLOMB, Juliet; STECKER, Eric; FAZAL, Fabeha; FLEMING, John O.; BAKER, Susan C.. Evolution of Mouse Hepatitis Virus (MHV) during Chronic Infection: quasispecies nature of the persisting mhv rna. **Virology**, [S.L.], v. 209, n. 2, p. 337-346, jun. 1995. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1995.1265>.

AGONDI, R. C; AUN, M. V; GIAVINA-BIANCHI, P. COVID-19, angiotensin-converting enzyme 2 and hydroxychloroquine. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 138-140, 2020. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2526-5393.20200018>.

AJALA, Olusegun S.; JUKOV, Azzaya; MA, Chao-Mei. Hepatitis C virus inhibitory hydrolysable tannins from the fruits of Terminalia chebula. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 99, p. 117-123, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.09.014>.

AKIHISA, Toshihiro; KOJIMA, Nobuo; KIKUCHI, Takashi; YASUKAWA, Ken; TOKUDA, Harukuni; MASTERS, Eliot T.; MANOSROI, Aranya; MANOSROI, Jiradej. Anti-Inflammatory and Chemopreventive Effects of Triterpene Cinnamates and Acetates from Shea Fat. **Journal Of Oleo Science**, [S.L.], v. 59, n. 6, p. 273-280, 2010. Japan Oil Chemists' Society. <http://dx.doi.org/10.5650/jos.59.273>.

AKTER, Masuma; PARVIN, Mst. Shahnaj; HASAN, Md. Mahadi; RAHMAN, Md. Aziz Abdur; ISLAM, Md. Ekramul. Anti-tumor and antioxidant activity of kaempferol-3-O-alpha-L-rhamnoside (Afzelin) isolated from Pithecellobium dulce leaves. **Bmc Complementary Medicine And Therapies**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 1-11, 22 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-022-03633-x>.

ALAGARASU, Kalichamy; PATIL, Poonam; KAUSHIK, Meenakshi; CHOWDHURY, Deepika; JOSHI, Rajesh K.; HEGDE, Harsha V.; KAKADE, Mahadeo B.; HOTI, Sugeerappa Laxmanappa; CHERIAN, Sarah; PARASHAR, Deepti. In Vitro Antiviral Activity of Potential Medicinal Plant Extracts Against Dengue and Chikungunya Viruses. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1-12, 7 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.866452>.

ALBUQUERQUE, Camila Holanda de; TAVARES, Josean Fechine; OLIVEIRA, Steno Lacerda de; SILVA, Tainá Souza; GONÇALVES, Gregório Fernandes; COSTA, Vicente Carlos de Oliveira; AGRA, Maria de Fátima; PESSÔA, Hilzeth de Luna Freire; SILVA, Marcelo Sobral da. FLAVONOID GLYCOSIDES FROM *Erythroxylum pulchrum* A. St.-Hil.

(Erythroxylaceae). **Química Nova**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 363-366, 2014. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd.. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140104>.

ALMEIDA, Andrea Farias. **Estratégias de Produção in vitro de Bioinsetocidade viral: Influências do isolado, da cinética e do modo de operação**. 2010. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

ANAND, Arumugam Vijaya; BALAMURALIKRISHNAN, Balasubramanian; KAVIYA, Mohandass; BHARATHI, Kathirvel; PARITHATHVI, Aluru; ARUN, Meyyazhagan; SENTHILKUMAR, Nachiappan; VELAYUTHAPRABHU, Shanmugam; SARADHADEVI, Muthukrishnan; AL-DHABI, Naif Abdullah. Medicinal Plants, Phytochemicals, and Herbs to Combat Viral Pathogens Including SARS-CoV-2. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1775, 22 mar. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26061775>.

ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira; CAMPOLINA-SILVA, Gabriel Henrique; QUEIROZ-JUNIOR, Celso Martins; OLIVEIRA, Leonardo Camilo de; LACERDA, Larisse de Souza Barbosa; PIMENTA, Jordane Clarisse; SOUZA, Filipe Resende Oliveira de; CHAVES, Ian de Meira; PASSOS, Ingredy Beatriz; TEIXEIRA, Danielle Cunha. A suitable murine model for studying respiratory coronavirus infection and therapeutic countermeasures in BSL-2 laboratories. **Biorxiv The Preprint Server For Biology**, [S.L.], p. 1-40, 29 maio 2021. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2021.05.28.446200>.

ANDRADE, Ana Cláudia dos Santos Pereira; CAMPOLINA-SILVA, Gabriel Henrique; QUEIROZ-JUNIOR, Celso Martins; OLIVEIRA, Leonardo Camilo de; LACERDA, Larisse de Souza Barbosa; GAGGINO, Jordane Clarisse Pimenta; SOUZA, Filipe Resende Oliveira de; CHAVES, Ian de Meira; PASSOS, Ingredy Beatriz; TEIXEIRA, Danielle Cunha. A Biosafety Level 2 Mouse Model for Studying Betacoronavirus-Induced Acute Lung Damage and Systemic Manifestations. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 95, n. 22, p. 1-18, 27 out. 2021. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01276-21>.

ANG, Lin; SONG, Eunhye; LEE, Hye Won; LEE, Myeong Soo. Herbal Medicine for the Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 1583, 23 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm9051583>

ANYWAR, Godwin Upoki; KAKUDIDI, Esezah; ORYEM-ORIGA, Hannington; SCHUBERT, Andreas; JASSOY, Christian. Cytotoxicity of Medicinal Plant Species Used by Traditional Healers in Treating People Suffering From HIV/AIDS in Uganda. **Frontiers In Toxicology**, [S.L.], v. 4, p. 1-8, 2 maio 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/ftox.2022.832780>.

ARAGAO, Gislei Frota; PINHEIRO, Marta Cristhiany Cunha; BANDEIRA, Paulo Nogueira; LEMOS, Telma Leda Gomes; VIANA, Glauce S. de Barros. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Isomeric Mixture of Alpha- and Beta-Amyrin from *Protium heptaphyllum*

(Aubl.) March. **Journal Of Herbal Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 31-47, jan. 2008. Informa UK Limited. [http://dx.doi.org/10.1080/j157v07n02\\_03](http://dx.doi.org/10.1080/j157v07n02_03).

ARAUJO, Marcelo F; SANTOS, Claudiana B. dos; CAVALCANTI, Jéssica F; PEREIRA, Fernanda S; MENDES, Gabriella S; WERLE, Alcení A; ROMANOS, Maria Teresa V; CARVALHO, Mário G. de. Compostos ativos propostos de *Ouratea parviflora*. **J. Med. Plants Res**, v. 5, p. 2489-2493, 2011.

ARJIN, Chaiwat; PRINGPROA, Kidsadagon; HONGSIBSONG, Surat; RUKSIRIWANICH, Warintorn; SEEL-AUDOM, Mintra; MEKCHAY, Supamit; SRINGARM, Korawan. In vitro screening antiviral activity of Thai medicinal plants against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Bmc Veterinary Research**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-9, 30 mar. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-020-02320-8>.

ARNOTT, John; PLANEY, Sonia Lobo. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [S.L.], v. 7, n. 10, p. 863-875, 19 set. 2012. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.

ARUMUGAM, Senthilkumar; DASH, Swati Sucharita; MITRA, Kartik; DOBLE, Mukesh; N.GUMMADI, Sathyanarayana. Potential of *Terminalia Arjuna* as a Promising Phytoremedy Against COVID-19: dpph scavenging, catalase inhibition and molecular docking studies. **Chemrxiv**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-39, 3 jul. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv.12600587.v1>.

BABU, Shyamaladevi; JAYARAMAN, Selvaraj. An update on  $\beta$ -sitosterol: a potential herbal nutraceutical for diabetic management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 131, p. 110702, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110702>.

BAGLA, Victor P.; MCGAW, Lyndy J.; ELOFF, Jacobus N.. The antiviral activity of six South African plants traditionally used against infections in ethnoveterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, [S.L.], v. 155, n. 2-4, p. 198-206, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.015>.

BAHUGUNA, Ashutosh; KHAN, Imran; BAJPAI, Vivek K.; KANG, Sun Chul. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 1-5, 8 abr. 2017. Bangladesh Journals Online (JOL). <http://dx.doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>.

BAHUN, Miha; JUKIĆ, Marko; OBLAK, Domen; KRANJC, Luka; BAJC, Gregor; BUTALA, Matej; BOZOVIČAR, Krištof; BRATKOVIČ, Tomaž; PODLIPNIK, Črtomir; ULRIH, Nataša Poklar. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 373, p. 131594, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131594>.

BASTOS, Katherine Xavier. **Estudo fitoquímico de *hancornia speciosa*: isolamento, atividade biológica e caracterização por cromatografia líquida de eficiência ultra elevada**

**acoplada à espectrometria de massas.** 2016. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/8819>. Acesso em: 16 nov. 2024.

BORKOTOKY, Subhomoi; BANERJEE, Manidipa. A computational prediction of SARS-CoV-2 structural protein inhibitors from *Azadirachta indica* (Neem). **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 39, n. 11, p. 4111-4121, 11 jun. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1774419>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF.** Disponível em: <http://covid.saude.gov.br>. Acesso em: 02 ago. 2023.

BRASIL. **Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira.** Brasília, DF. Disponível em: <http://www.sibbr.gov.br>. Acesso em 06 ago. 2022.

CALY, Leon; DRUCE, Julian D.; CATTON, Mike G.; JANS, David A.; WAGSTAFF, Kylie M.. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 178, p. 104787, jun. 2020. Elsevier BV. .CHAFEKAR, Aasiyah; FIELDING, Burtram. MERS-CoV: understanding the latest human coronavirus threat. **Viruses**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 93, 24 fev. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v10020093>.

CAMPANA, Priscilla R. V.; MANSUR, Daniel S.; GUSMAN, Grasielle S.; FERREIRA, Daneel; TEIXEIRA, Mauro M.; BRAGA, Fernão C.. Anti-TNF- $\alpha$  Activity of Brazilian Medicinal Plants and Compounds from *Ouratea semiserrata*. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 1509-1515, 22 jun. 2015. Wiley.

CARDOSO, Claudia Andréa Lima; COELHO, Roberta Gomes; HONDA, Neli Kika; POTT, Arnildo; PAVAN, Fernando Rogério; LEITE, Clarice Queico Fujimura. Phenolic compounds and antioxidant, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Serjania erecta* Radlk. (Sapindaceae). **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 775-782, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502013000400017>.

CARVALHO, O.V.; OLIVEIRA, F.s.; SARAIVA, G.L.; BOTELHO, C.V.; FERREIRA, H.C.C.; SANTOS, M.R.; SILVA JÚNIOR, A.; ALMEIDA, M.R.. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 353-358, abr. 2013. **FapUNIFESP** (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352013000200008>.

CHANNAPPANAVAR, Rudragouda; PERLMAN, Stanley. Pathogenic human coronavirus infections: causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. **Seminars In Immunopathology**, [S.L.], v. 39, n. 5, p. 529-539, 2 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-017-0629-x>.

CHAVES, Mariana H.; LOPES, Citó Antônia Maria das Graças; LOPES, José Arimatéia Dantas; COSTA, Danielly Albuquerque da; OLIVEIRA, Carlos Antônio A. de; COSTA, Ana Flávia; BRITO JÚNIOR, Francisco Eleodoro M.. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 106-112, mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2010000100021>.

CHEEVER, F. Sargent; DANIELS, Joan B.; PAPPENHEIMER, Alwin M.; BAILEY, Orville T.. A MURINE VIRUS (JHM) CAUSING DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS WITH EXTENSIVE DESTRUCTION OF MYELIN. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 90, n. 3, p. 181-194, 1 set. 1949. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.90.3.181>.

CHENG, Hua-Yew; LIN, Chun-Ching; LIN, Ta-Chen. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 447-455, set. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00077-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00077-3).

CHIKHALE, Rupesh V.; GUPTA, Vivek K.; ELDESOKY, Gaber E.; WABAIDUR, Saikh M.; PATIL, Shripad A.; ISLAM, Md Ataul. Identification of potential anti-TMPRSS2 natural products through homology modelling, virtual screening and molecular dynamics simulation studies. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 39, n. 17, p. 6660-6675, 3 ago. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1798813>.

CHIKHALE, Rupesh V.; SINHA, Saurabh K.; KHANAL, Pukar; GURAV, Nilambari S.; AYYANAR, Muniappan; PRASAD, Satyendra K.; WANJARI, Manish M.; PATIL, Rajesh B.; GURAV, Shailendra S.. Computational and network pharmacology studies of *Phyllanthus emblica* to tackle SARS-CoV-2. **Phytomedicine Plus**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 100095, ago. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100095>.

CHINSEMBU, Kazhila C.. Coronaviruses and Nature's Pharmacy for the Relief of Coronavirus Disease 2019. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 30, n. 5, p. 603-621, out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-020-00104-7>.

CHIUW, K.H.; PHOON, M.C.; PUTTI, Thomas; TAN, Benny K.H.; CHOW, Vincent T.. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. **Asian Pacific Journal Of Tropical Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-7, jan. 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.12.002>.

COELHO-DOS-REIS, Jordana Graziela A.; GOMES, Orlando Ab; BORTOLINI, Dener E.; MARTINS, Marina L.; ALMEIDA, Marcia R.; MARTINS, Camila S.; CARVALHO, Luciana D.; SOUZA, Jaqueline G.; VILELA, Jose Mario C.; ANDRADE, Margareth S.. Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempherol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 174, n. 1-2, p. 47-52, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.019>.

COMANDINI, Patrizia; LERMA-GARCÍA, María Jesús; SIMÓ-ALFONSO, Ernesto Francisco; TOSCHI, Tullia Gallina. Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD-MS. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 157, p. 290-295, ago. 2014. Elsevier BV.

COS, Paul; VLIETINCK, Arnold J.; BERGHE, Dirk Vanden; MAES, Louis. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 106, n. 3, p. 290-302, jul. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>.

DAS, Gitishree; KIM, Do-Yeong; FAN, Chen; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, Erick P.; HEREDIA, J. Basilio; NISSAPATORN, Veeranoot; MITSUWAN, Watcharapong; PEREIRA, Maria Lourdes; NAWAZ, Muhammad; SIYADATPANAH, Abolghasem. Plants of the Genus Terminalia: an insight on its biological potentials, pre-clinical and clinical studies. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 11, p. 1-30, 8 out. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.561248>.

DEJ-ADISAI, Sukanya; RAIS, Ichwan Ridwan; WATTANAPIROMSAKUL, Chatchai; PITAKBUT, Thanet. Alpha-Glucosidase Inhibitory Assay-Screened Isolation and Molecular Docking Model from Bauhinia pulla Active Compounds. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 19, p. 5970, 1 out. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26195970>.

DIANTINI, Ajeng; SUBARNAS, Anas; LESTARI, Keri; HALIMAH, Eli; SUSILAWATI, Yasmiwar; SUPRIYATNA; JULAEHA, Euis; ACHMAD, Tri H.; SURADJI, Eka W.; YAMAZAKI, Chiho. Kaempferol-3-O-rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth. inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 3, n. 5, p. 1069-1072, 9 fev. 2012. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2012.596>.

DIAS, Maria Celeste; PINTO, Diana C. G. A.; SILVA, Artur M. S.. Plant Flavonoids: chemical characteristics and biological activity. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 17, p. 5377, 4 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26175377>.

DIAS, Marluce Oliveira; HAMERSKI, Lidilhone; PINTO, Angelo C.. Separação semipreparativa de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 704-706, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422011000400026>.

DU, Ruikun; COOPER, Laura; CHEN, Zinuo; LEE, Hyun; RONG, Lijun; CUI, Qinghua. Discovery of chebulagic acid and punicalagin as novel allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 3CLpro. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 190, p. 105075, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105075>.

DURGE, Ankita; JADAUN, Pratiksha; WADHWANI, Ashish; CHINCHANSURE, Ashish A.; SAID, Madhukar; THULASIRAM, H. V.; JOSHI, Swati P.; KULKARNI, Smita S.. Acetone and methanol fruit extracts of *Terminalia paniculata* inhibit HIV-1 infection in vitro. **Natural**

**Product Research**, [S.L.], v. 31, n. 12, p. 1468-1471, 20 nov. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1258561>.

EFDI, Mai; PRATAMA, Dara; ITAM, Afrizal; OKSELNI, Tia. Antioxidant Flavonoid Glycoside from Leaves of Cacao Mistletoe (*Scurrula ferruginea* (Jack) Danser). **Indonesian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 4, p. 944-952, 2 jun. 2022. Universitas Gadjah Mada. <http://dx.doi.org/10.22146/ijc.72133>.

EYRE, David W.; TAYLOR, Donald; PURVER, Mark; CHAPMAN, David; FOWLER, Tom; POUWELS, Koen B.; WALKER, A. Sarah; PETO, Tim E.A.. Effect of Covid-19 Vaccination on Transmission of Alpha and Delta Variants. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 386, n. 8, p. 744-756, 24 fev. 2022. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2116597>.

FAHMY, NM; AL-SAYED E; SINGAB, AN. Genus Terminalia: a phytochemical and biological review. **Medicinal & Aromatic Plants**, [S.L.], v. 04, n. 05, p. 1-22, 2015. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000218>.

FAJRIAH, SOFÁ; DARMAWAN, AHMAD; WATI, MEGAWATI; HANAFI, MUHAMMAD. Isolation and Identification of Quercetin Derivatives and their alpha-Glucosidase Inhibitory Activities from *Bryophyllum pinnatum*. **Revista de Pesquisa de Química e Environment**, Indonésia, v. 22, n. 3, p. 114-119, ago. 2018.

FANG, Yingying; GUO, Yan; GAO, Tongtong; HAN, Xuelian; JIANG, Yuting; LI, Min; XUE, Wei; YANG, Binhui; CUI, Yujun; SUN, Shihui. A Dual Role of Complement Activation in the Development of Fulminant Hepatic Failure Induced by Murine-Beta-Coronavirus Infection. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1-12, 29 abr. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.880915>.

FERREIRA, Gabriel Monteze; SILVA, Breno de Mello; SOUZA, Gustavo Henrique Bianco de; OLIVEIRA, Alaíde Braga de; BRANDÃO, Geraldo Célio. Anti-Zika Activity of *Ouratea semiserrata* and Dereplication of Its Constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 121-125, 5 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s43450-021-00129-6>.

FIDELIS, Queli C.; RIBEIRO, Tereza A.N.; ARAÚJO, Marcelo F.; CARVALHO, Mario G. de. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 1-19, jan. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-695x20142413361>.

FLORENTINO NETO, Serafim. **Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica *in vitro* de nanopartículas poliméricas contendo  $\alpha$ - $\beta$  amirina**. 2018. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

FUZO, Carlos A.; MARTINS, Ronaldo B.; FRAGA-SILVA, Thais F. C.; AMSTALDEN, Martin K.; LEO, Thais Canassa de; SOUZA, Juliano P.; LIMA, Thais M.; FACCIOLI, Lucia H.; OKAMOTO, Débora Noma; JULIANO, Maria Aparecida. Celastrol: a lead compound that inhibits sars :cov :2 replication, the activity of viral and human cysteine proteases, and virus :induced il :6 secretion. **Drug Development Research**, [S.L.], v. 83, n. 7, p. 1623-1640, 21 ago. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ddr.21982>.

GALLOTA, A. L. Q. ACONSTITUINTES QUÍMICOS DA RAIZ E DO TALO DA FOLHA DO AÇAÍ (Euterpe precatoria MART., ARECACEAE). **Química Nova**, Vol. 28, N. 4, p. 610-613, 2005.

GAVRIATOPOULOU, Maria; NTANANIS-STATHOPOULOS, Ioannis; KOROMPOKI, Eleni; FOTIOU, Despina; MIGKOU, Magdalini; TZANNINIS, Ioannis-Georgios; PSALTOPOULOU, Theodora; KASTRITIS, Efstathios; TERPOS, Evangelos; DIMOPOULOS, Meletios A.. Emerging treatment strategies for COVID-19 infection. **Clinical And Experimental Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 167-179, 30 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10238-020-00671-y>.

GHOSH, Rajesh; BADAVATH, Vishnu Nayak; CHOWDHURI, Snehasis; SEN, Anik. Identification of Alkaloids from Terminalia chebula as Potent SARS- CoV-2 Main Protease Inhibitors: an *in silico* perspective. **Chemistryselect**, [S.L.], v. 7, n. 14, p. 1-12, 11 abr. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/slct.202200055>.

GIOFRÈ, Salvatore Vincenzo; NAPOLI, Edoardo; IRACI, Nunzio; SPECIALE, Antonio; CIMINO, Francesco; MUSCARÀ, Claudia; MOLONIA, Maria Sofia; RUBERTO, Giuseppe; SAIJA, Antonella. Interaction of selected terpenoids with two SARS-CoV-2 key therapeutic targets: an *in silico* study through molecular docking and dynamics simulations. **Computers In Biology And Medicine**, [S.L.], v. 134, p. 104538, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104538>.

GOC, Anna; SUMERA, Waldemar; RATH, Matthias; NIEDZWIECKI, Aleksandra. Phenolic compounds disrupt spike-mediated receptor-binding and entry of SARS-CoV-2 pseudo-virions. **Plos One**, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 1-20, 17 jun. 2021. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0253489>.

GOMES, José Hugo de Sousa; MBIAKOP, Ulrich Carlos; OLIVEIRA, Renata Leite; STEHMANN, João Renato; PÁDUA, Rodrigo Maia de; CORTES, Steyner F.; BRAGA, Fernão Castro. Polyphenol-rich extract and fractions of Terminalia phaeocarpa Eichler possess hypoglycemic effect, reduce the release of cytokines, and inhibit lipase,  $\alpha$ -glucosidase, and  $\alpha$ -amilase enzymes. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 271, p. 113847, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.113847>.

GOULART, M. O. I.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; Fitoconstituíntes químicos isolados de Jatropha Elliptica. Atribuição dos deslocamentos

químicos dos átoos de carbono e hidrogênio dos diterpenos Jatrolonas. **Química Nova**, V. 16, p. 95-100, 1993.

GOWDA, Pruthvi; PATRICK, Shruti; JOSHI, Shanker Datt; KUMAWAT, Rajesh Kumar; SEN, Ellora. Glycyrrhizin prevents SARS-CoV-2 S1 and Orf3a induced high mobility group box 1 (HMGB1) release and inhibits viral replication. **Cytokine**, [S.L.], v. 142, p. 155496, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155496>.

GRASEL, Fábio dos Santos; FERRÃO, Marco Flôres; WOLF, Carlos Rodolfo. Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 91, p. 279-285, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.022>.

GREIN, Jonathan; OHMAGARI, Norio; SHIN, Daniel; DIAZ, George; ASPERGES, Erika; CASTAGNA, Antonella; FELDT, Torsten; GREEN, Gary; GREEN, Margaret L.; LESCURE, François-Xavier. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 24, p. 2327-2336, 11 jun. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2007016>.

GRYNBERG, N.F.; CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; MOREIRA, I.C.; BRAZ- FILHO, R.; ECHEVARRIA, A.. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from ouratea species. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, [S.L.], v. 35, n. 7, p. 819-822, jul. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2002000700009>.

GUPTA, Devanand; BHASKAR, D. J.; GUPTA, Rajendra Kumar; KARIM, Bushra; GUPTA, Vipul; PUNIA, Himanshu; BATRA, Manu; JAIN, Ankita; AGARWAL, Amit; SINGH, Pradeep. Effect of Terminalia chebula Extract and Chlorhexidine on Salivary pH and Periodontal Health: 2 weeks randomized control trial. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 28, n. 7, p. 992-998, 10 out. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.5075>.

GUTIÉRREZ-ROMÁN, Ana Silvia; GONZALEZ-CORTAZAR, Manasés; TREJO-TAPIA, Gabriela; HERRERA-RUIZ, Maribel; ZAMILPA, Alejandro; SANCHEZ-MENDOZA, Ernesto; SANCHEZ, Natividad Giovana de La Cruz; JIMÉNEZ-FERRER, Enrique. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from Salvia elegans Vahl. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 35, n. 23, p. 5344-5349, 29 abr. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2020.1758093>.

HAAKE, Christine; COOK, Sarah; PUSTERLA, Nicola; MURPHY, Brian. Coronavirus Infections in Companion Animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 1023, 13 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12091023>.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 41, n. 12, p. 1100-1115, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.

HELENO, Sandrina A.; CAROCHO, Marcio; REIS, Filipa S.; PIRES, Tânia C. S. P.; PINTADO, Manuela; FERREIRA, Isabel C. F. R.; BARROS, Lillian. Plant Extracts and SARS-CoV-2: research and applications. **Life**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 386, 31 jan. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life13020386>.

HU, Ben; GUO, Hua; ZHOU, Peng; SHI, Zheng-Li. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 141-154, 6 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.

IGGO, Jonathan A.; LIU, Jianke; OVEREND, Gillian. The Indirect Detection of Metal Nuclei by Correlation Spectroscopy (HSQC and HMQC). **Annual Reports On Nmr Spectroscopy**, [S.L.], p. 179-262, 2008. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0066-4103\(07\)63004-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0066-4103(07)63004-x).

IHEAGWAM, Franklyn Nonso; ISRAEL, Emmanuel Nsedu; KAYODE, Kazeem Oyindamola; CAMPOS, Opeyemi Christianah de; OGUNLANA, Olubanke Olujoke; CHINEDU, Shalom Nwodo. GC-MS Analysis and Inhibitory Evaluation of Terminalia catappa Leaf Extracts on Major Enzymes Linked to Diabetes. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2019, p. 1-14, 5 set. 2019. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/6316231>.

ISLAS-GARDUÑO, Ana Laura; ROMERO-CERECERO, Ofelia; JIMÉNEZ-APARICIO, Antonio Ruperto; TORTORIELLO, Jaime; MONTIEL-RUIZ, Rosa Mariana; GONZÁLEZ-CORTAZAR, Manases; ZAMILPA, Alejandro. Pharmacological and Chemical Analysis of Bauhinia divaricata L. Using an In Vitro Antiadipogenic Model. **Plants**, [S.L.], v. 12, n. 22, p. 3799, 8 nov. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12223799>.

JACKSON, Cody B.; FARZAN, Michael; CHEN, Bing; CHOE, Hyeryun. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 3-20, 5 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.

JAIME, María F Visintini; REDKO, Flavia; MUSCHIETTI, Liliana V; CAMPOS, Rodolfo H; MARTINO, Virginia s; CAVALLARO, Lucia V. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-10, 27 jul. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-10-245>.

JO, Seri; KIM, Suwon; SHIN, Dong Hae; KIM, Mi-Sun. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. **Journal Of Enzyme Inhibition And Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 145-151, 14 nov. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14756366.2019.1690480>.

JOHANN, S.; SOLDI, C.; LYON, J.P.; PIZZOLATTI, M.G.; RESENDE, M.A.. Antifungal activity of the amyirin derivatives and in vitro inhibition of Candida albicans adhesion to human

epithelial cells. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 148-153, ago. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02162.x>.

KAGAMBEGA, Windmi; BELEM, Hadidjatou; MEDA, Roland Nâg-Tiéro; KOAMA, Benjamin Kouliga; DRABO, Anne-Flora; KABORE, Jacques; TRAORE, Amadou; OUÉDRAOGO, Georges Anicet; BENEDEC, Daniela; HANGANU, Daniela. Polyphenolic Profile, Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Activities of Some African Medicinal Plants. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1377, 22 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11101377>.

KANDEIL, Ahmed; MOSTAFA, Ahmed; KUTKAT, Omnia; MOATASIM, Yassmin; AL-KARMALAWY, Ahmed A.; RASHAD, Adel A.; KAYED, Ahmed E.; KAYED, Azza E.; EL-SHESHENY, Rabeh; KAYALI, Ghazi. Bioactive Polyphenolic Compounds Showing Strong Antiviral Activities against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Pathogens**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 758, 15 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10060758>.

KAR, Pallab; SALEH-E-IN, Md. Moshfekus; JAISHEE, Nishika; ANANDRAJ, Akash; KORMUTH, Emil; VELLINGIRI, Balachandar; ANGIONE, Claudio; RAHMAN, Pattanathu K. S. M.; PILLAY, Suntheren; SEN, Arnab. Computational profiling of natural compounds as promising inhibitors against the spike proteins of SARS-CoV-2 wildtype and the variants of concern, viral cellentry process, and cytokine storm in COVID-19. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 123, n. 5, p. 964-986, 27 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.30243>.

KESHARWANI, Ajay; POLACHIRA, Suja Kizhiyedath; NAIR, Reshmi; AGARWAL, Aakanksha; MISHRA, Nripendra Nath; GUPTA, Satish Kumar. Anti-HSV-2 activity of Terminalia chebula Retz extract and its constituents, chebulagic and chebulinic acids. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-11, 14 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1620-8>.

KHAN, Sharuk L.; SIDDIQUI, Falak A. Beta-Sitosterol: As Immunostimulant, Antioxidant and Inhibitor of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein: as immunostimulant, antioxidant and inhibitor of sars-cov-2 spike glycoprotein. **Archives Of Pharmacology And Therapeutics**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 12-16, 31 dez. 2020. Scientific Archives LLC. <http://dx.doi.org/10.33696/pharmacol.2.014>.

KIM, Hye-Young; EO, Eun-Young; PARK, Hyun; KIM, Youn-Chul; PARK, Sun; SHIN, Ho-Joon; KIM, Kyongmin. Medicinal herbal extracts of Sophorae radix Acanthopanax cortex Sanguisorbae radix and Torilis fructus inhibit coronavirus replication in vitro. **Antiviral Therapy**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 697-709, jul. 2010. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3851/imp1615>.

KIM, Hye-Young; SHIN, Hyun-Soo; PARK, Hyun; KIM, Youn-Chul; YUN, Yong Gab; PARK, Sun; SHIN, Ho-Joon; KIM, Kyongmin. In vitro inhibition of coronavirus replications

by the traditionally used medicinal herbal extracts, *Cimicifuga rhizoma*, *Meliae cortex*, *Coptidis rhizoma*, and *Phellodendron cortex*. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 122-128, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.011>.

KIM, Tae Gyun; KANG, Seog Youn; JUNG, Ki Kyung; KANG, Ju Hye; LEE, Euna; HAN, Hyung Mee; KIM, Seung Hee. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 718-720, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.832>.

KÖRNER, Robert; MAJJOUTI, Mohamed; ALCAZAR, Miguel; MAHABIR, Esther. Of Mice and Men: the coronavirus mhv and mouse models as a translational approach to understand sars-cov-2. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 880, 12 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12080880>.

KRISHNAN, Kripa; MATHEW, Limi Elizabeth; VIJAYALAKSHMI, N. R.; HELEN, A. Anti-inflammatory potential of  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. **Inflammopharmacology**, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 373-385, 10 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-014-0218-8>.

KUMAR, S. Birendra; KRISHNA, Swati; PRADEEP, Sneha; MATHEWS, Divya Elsa; PATTABIRAMAN, Ramya; MURAHARI, Manikanta; MURTHY, T.P. Krishna. Screening of natural compounds from *Cyperus rotundus* Linn against SARS-CoV-2 main protease (Mpro): an integrated computational approach. **Computers In Biology And Medicine**, [S.L.], v. 134, p. 104524, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbimed.2021.104524>

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K.. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2013, n. 1, p. 1-16, jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.

LAMB, Yvette N.. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: first approval. **Drugs**, [S.L.], v. 82, n. 5, p. 585-591, 19 mar. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-022-01692-5>.

LEE, Doseung. Anti-bacterial and Anti-viral Activities of Extracts from *Terminalia chebula* Barks. **Journal Of The Korean Society For Applied Biological Chemistry**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 295-298, 30 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.3839/jksabc.2011.046>.

LEE, Sang; SO, Young-Jin; SHIN, Moon; CHO, Jae; LEE, Jongsung. Antibacterial Effects of Afzelin Isolated from *Cornus macrophylla* on *Pseudomonas aeruginosa*, A Leading Cause of Illness in Immunocompromised Individuals. **Molecules**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 3173-3180, 17 mar. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19033173>.

LEE, Sunny Chung; AHN, Jongmin; KIM, Jina; LEE, Joo-Yeon; KIM, Juhae; UDDIN, Md. Salah; LEE, Sang Woo; KIM, Choon Young. The Antioxidant and Anti-Inflammatory

Properties of Merremia umbellata Extract. **Antioxidants**, [S.L.], v. 12, n. 12, p. 2037, 23 nov. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox12122037>.

LEE, Yeong-Geun; KANG, Kyung Won; HONG, Woojae; KIM, Yeon Hwa; OH, Jen Taek; PARK, Dae Won; KO, Minsung; BAI, Yun-Feng; SEO, Young-Jin; LEE, Sang-Myeong. Potent antiviral activity of Agrimonia pilosa, Galla rhois, and their components against SARS-CoV-2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 45, p. 116329, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116329>.

LI, Ping.; DU, Ruikun.; WANG, Yanyan.; HOU, X.; WANG, Lin.; ZHAO, Xiujuan.; ZHAN, Peng.; LIU, Xinyong.; RONG, Lijun .; CUI, Qinghua. Identification of Chebulinic Acid and Chebulagic Acid as Novel Influenza Viral Neuraminidase Inhibitors. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 182, 2020.

LI, Ping; DU, Ruikun; CHEN, Zinuo; WANG, Yanyan; ZHAN, Peng; LIU, Xinyong; KANG, Dongwei; CHEN, Zhaoyu; ZHAO, Xiujuan; WANG, Lin. Punicalagin is a neuraminidase inhibitor of influenza viruses. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 93, n. 6, p. 3465-3472, 29 set. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.26449>.

LI, Ping; DU, Ruikun; WANG, Yanyan; HOU, Xuewen; WANG, Lin; ZHAO, Xiujuan; ZHAN, Peng; LIU, Xinyong; RONG, Lijun; CUI, Qinghua. Identification of Chebulinic Acid and Chebulagic Acid as Novel Influenza Viral Neuraminidase Inhibitors. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 11, p. 1-9, 28 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00182>.

LI, S; CHEN, C; ZHANG, H; GUO, H; WANG, H; WANG, L; ZHANG, X; HUA, S; YU, J; XIAO, P. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 18-23, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2005.02.007>.

LIN, Cheng-Wen; TSAI, Fuu-Jen; TSAI, Chang-Hai; LAI, Chien-Chen; WAN, Lei; HO, Tin-Yun; HSIEH, Chang-Chi; CHAO, Pei-Dawn Lee. Anti-SARS coronavirus 3C-like protease effects of Isatis indigotica root and plant-derived phenolic compounds. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 36-42, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antivira.2005.07.002>.

LIN, Liang-Tzung; CHEN, Ting-Ying; CHUNG, Chueh-Yao; NOYCE, Ryan S.; GRINDLEY, T. Bruce; MCCORMICK, Craig; LIN, Ta-Chen; WANG, Guey-Horng; LIN, Chun-Ching; RICHARDSON, Christopher D.. Hydrolyzable Tannins (Chebulagic Acid and Punicalagin) Target Viral Glycoprotein-Glycosaminoglycan Interactions To Inhibit Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 85, n. 9, p. 4386-4398, maio 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01492-10>.

LING, Li-Jun; LU, Yan; ZHANG, Yun-Yi; ZHU, Hai-Yan; TU, Peng; LI, Hong; CHEN, Dao-Feng. Flavonoids from Houttuynia cordata attenuate H1N1-induced acute lung injury in mice

via inhibition of influenza virus and Toll-like receptor signalling. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 67, p. 153150, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153150>.

LINGUA, Giuliana; CHAVES, Ana Guadalupe; AGUILAR, Juan Javier; MARTINEZ, Florencia; GOMEZ, Tomás Isaac; RUCCI, Kevin Alen; TORRES, Lorena E.; ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen; ESPARZA, Irene; JIMÉNEZ-MORENO, Nerea. Antiviral Potential and Chemical Composition of Wild *Baccharis crispa* Spreng. Populations (Asteraceae) from Córdoba, Argentina: perspective on population variability. *Plants*, [S.L.], v. 13, n. 21, p. 3077, 1 nov. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants13213077>.

LIU, Bingrun; CHEN, Fuguang; BI, Chongwei; WANG, Lin; ZHONG, Xiaobo; CAI, Hongjun; DENG, Xuming; NIU, Xiaodi; WANG, Dacheng. Quercitrin, an Inhibitor of Sortase A, Interferes with the Adhesion of *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 6533-6543, 13 abr. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20046533>.

LIU, Manjuan; KATERERE, David R.; GRAY, Alexander I.; SEIDEL, Véronique. Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 80, n. 6, p. 369-373, set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2009.05.006>.

LIU, Yang; FUNK, Sebastian; FLASCHE, Stefan. The contribution of pre-symptomatic infection to the transmission dynamics of COVID-2019. **Wellcome Open Research**, [S.L.], v. 5, p. 58, 1 abr. 2020. F1000 Research Ltd. <http://dx.doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15788.1>.

LOIZOU, Stella; LEKAKIS, Ioannis; CHROUSOS, George P.; MOUTSATSOU, Paraskevi.  $\beta$ -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 551-558, 24 nov. 2009. **Wiley**. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200900012>.

LOOSDRECHT, A.A. van de; BEELEN, R.H.J.; OSSENKOPPELE, G.J.; BROEKHOVEN, M.G.; LANGENHUIJSEN, M.M.A.C.. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 174, n. 1-2, p. 311-320, set. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90034-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90034-5).

LUBBE, Lizelle; COZIER, Gyles E.; OOSTHUIZEN, Delia; ACHARYA, K. Ravi; STURROCK, Edward D.. ACE2 and ACE: structure-based insights into mechanism, regulation and receptor recognition by sars-cov. **Clinical Science**, [S.L.], v. 134, n. 21, p. 2851-2871, nov. 2020. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/cs20200899>.

LUHATA, Pierre Lokadi. Isolamento and Characterisation of Estigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). **Revista de Inovações em Ciências Farmacêuticas e Biológicas Sciences**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 88-96, 2015. Unpublished. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3689.7365>.

LUHATA, Pierre Lokadi. Isolation and Characterisation of Stigmasterol and B -Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). **Revista de Inovações em Ciências Farmacêuticas e Biológicas Sciences**, [S.L.], p. 88-96, 2015. Unpublished. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.3689.7365>.

MA, J; HUO, Xiao-Qian; CHEN, Xi; ZHU, Wei-Xing; YAO, Mei-Cun; QIAO, Yan-Jiang; ZHANG, Yan-Ling. [Study on screening potential traditional Chinese medicines against 2019-nCoV based on Mpro and PLP]. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 45, p. 1219-1224, 2020. <http://dx.doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20200216.401>.

MACDONALD, Ian A.; MADER, Judith A.; BUSSARD, Robert G.. The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva. **Mutation Research Letters**, [S.L.], v. 122, n. 2, p. 95-102, nov. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992\(83\)90044-1](http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992(83)90044-1).

MAJUMDER, Joydeb; MINKO, Tamara. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. **The Aaps Journal**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-22, jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1208/s12248-020-00532-2>.

MAKATI, Annisa Camellia; ANANDA, Aghnia Nabila; PUTRI, Jasmine Aisyah; AMELLIA, Siti Feritasia; SETIAWAN, Bambang. Molecular docking of ethanol extracts of katuk leaf (*Sauropus androgynus*) on functional proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **South African Journal Of Botany**, [S.L.], v. 149, p. 1-5, set. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2022.04.044>.

MAURYA, Vimal K.; KUMAR, Swatantra; BHATT, Madan L. B.; SAXENA, Shailendra K.. Antiviral activity of traditional medicinal plants from Ayurveda against SARS-CoV-2 infection. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 1719-1735, 19 out. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1832577>.

MAURYA, Vimal K.; KUMAR, Swatantra; PRASAD, Anil K.; BHATT, Madan L. B.; SAXENA, Shailendra K.. Structure-based drug designing for potential antiviral activity of selected natural products from Ayurveda against SARS-CoV-2 spike glycoprotein and its cellular receptor. **Virusdisease**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 179-193, 24 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13337-020-00598-8>.

MBOUNA, Cedric Derick Jiatsa; TALI, Brice Mariscal Tchatat; FOKOU, Patrick Valere Tsouh; KEMGNE, Eugenie Aimee Madiesse; KEUMOE, Rodrigue; KOUIPOU, Rufin Marie Toghueo; TCHOKOUAHA, Lauve Rachel Yamthe; TCHUENMOGNE, Marthe Aimée Tchunte; KENOU, Donald Kagho; SAHAL, Dinkar. Specific sub fractions from *Terminalia mantaly* (H. Perrier) extracts potently inhibit *Plasmodium falciparum* rings, merozoite egress and invasion. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 285, p. 114909, mar. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.114909>.

MEHRBOD Parvaneh; ABDALLA, Muna A.; NJOYA, Emmanuel M.; AHMED, Aroke S.; FOTOUHI, Fatemeh; FARAHMAND, Behrokh; GADO, Dorcas A.; TABATABAIAN, Mansoureh; FASANMI, Olubunmi G.; ELOFF, Jacobus N.. South African medicinal plant extracts active against influenza A virus. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-10, 27 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-018-2184-y>.

MERINGOLO, Luciano; BONESI, Marco; SICARI, Vincenzo; ROVITO, Simone; PASSALACQUA, Nicodemo Giuseppe; LOIZZO, Monica Rosa; TUNDIS, Rosa. Essential Oils and Extracts of *Juniperus macrocarpa* Sm. and *Juniperus oxycedrus* L.: comparative phytochemical composition and anti-proliferative and antioxidant activities. *Plants*, [S.L.], v. 11, n. 8, p. 1025, 9 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11081025>.

MONTANHA, A; MOELLERKE, Patrícia; BORDIGNON, Sérgio A.L; SCHENKEL, Eloir P; ROEHE, Paulo M. Antiviral Activity of Brazilian Plant Extracts Jarbas. **Acta Farm. Bonaerense** 23 (2): 183-6 (2004).

MORSE, J. S. Learning from the Past: possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-ncov. **Chembiochem**, [S.L.], p. 730-738, 27 jan. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.26434/chemrxiv.11728983.v1>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MOUSAVIZADEH, Leila; GHASEMI, Sorayya. Genotype and phenotype of COVID-19: their roles in pathogenesis. **Journal Of Microbiology, Immunology And Infection**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 159-163, abr. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022>.

MUCHTARIDI, Muchtaridi; FAUZI, M.; IKRAM, Nur Kusaira Khairul; GAZZALI, Amirah Mohd; WAHAB, Habibah A.. Natural Flavonoids as Potential Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitors for Anti-SARS-CoV-2. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 17, p. 3980, 1 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25173980>.

MURALIDAR, Shibi; AMBI, Senthil Visaga; SEKARAN, Saravanan; KRISHNAN, Uma Maheswari. The emergence of COVID-19 as a global pandemic: understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of sars-cov-2. **Biochimie**, [S.L.], v. 179, p. 85-100, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>.

NAIR, M.S.; HUANG, Y.; FIDOCK, D.A.; POLYAK, S.J.; WAGONER, J.; TOWLER, M.J.; WEATHERS, P.J.. *Artemisia annua* L. extracts inhibit the in vitro replication of SARS-CoV-2 and two of its variants. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 274, p. 114016, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.114016>.

NASCIMENTO, José Eranildo Teles do; RODRIGUES, Ana Livya Moreira; LISBOA, Daniele Silva de; LIBERATO, Hortência Ribeiro; FALCÃO, Maria José Cajazeiras; SILVA, Cecília Rocha da; NOBRE JÚNIOR, Hélio Vitoriano; BRAZ FILHO, Raimundo; PAULA JUNIOR, Valdir Ferreira de; ALVES, Daniela Ribeiro. Chemical Composition and Antifungal In Vitro and In Silico, Antioxidant, and Anticholinesterase Activities of Extracts and Constituents of *Ouratea fieldingiana* (DC.) Baill. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2018, p. 1-12, 7 nov. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1748487>.

NASEEM, Bushra; SHAH, S.W.H.; HASAN, Aurangzeb; SHAH, S. Sakhawat. Interaction of flavonoids, the naturally occurring antioxidants with different media: a uv••visible spectroscopic study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 1341-1346, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2009.12.083>.

NAVID, M. Heidary; LASZCZYK-LAUER, M.N.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1273-1280, set. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.06.007>.

NOPKUESUK, Napapuch; KLAMRAK, Anuwachakij; NABNUEANGSAP, Jaran; NARKPUK, Jaraspim; RAHMAN, Shaikh Shahinur; SAENGKUN, Yutthakan; JANPAN, Piyapon; SOONKUM, Thananya; SITTHIWONG, Poramet; JANGPROMMA, Nisachon. Hydroethanolic extract of *Schinus terebinthifolia* as a promising source of anti-influenza agents: phytochemical profiling, cheminformatics, molecular docking and dynamics simulations. *Plos One*, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 1-32, 2 jun. 2025. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0324990>.

OGBOLE, Omonike O.; AKINLEYE, Toluwanimi E.; NKUMAH, Abraham O.; AWOGUN, Aminat O.; ATTAH, Alfred F.; ADEWUMI, Moses O.; ADENIJI, Adekunle J.. In vitro antiviral activity of peptide-rich extracts from seven Nigerian plants against three non-polio enterovirus species C serotypes. **Virology Journal**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 1-7, 4 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-021-01628-7>.

OGBOLE, Omonike O.; AKINLEYE, Toluwanimi E.; SEGUN, Peter A.; FALEYE, Temitope C.; ADENIJI, Adekunle J.. In vitro antiviral activity of twenty-seven medicinal plant extracts from Southwest Nigeria against three serotypes of echoviruses. **Virology Journal**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-8, 18 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-018-1022-7>.

OKOYE, Nkeoma Nkasi; AJAGHAKU, Daniel Lotanna; OKEKE, Henry Nnaemeka; ILODIGWE, Emmanuel Emeka; NWORU, Chukwuemeka Sylvester; OKOYE, Festus Basden C.. Beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 52, n.

11, p. 1478-1486, 15 jul. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2014.898078>.

OLIVEIRA, Grazielle Pereira; KROON, Erna Geessien. Mouse hepatitis virus: a betacoronavirus model to study the virucidal activity of air disinfection equipment on surface contamination. **Journal Of Virological Methods**, [S.L.], v. 297, p. 114274, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114274>.

OLIVEIRA, Jessica Sara de Sousa Macêdo; SANTOS, Lucivania Rodrigues dos; CARVALHO, Adonias Almeida; SOUSA, Renato Pinto de; VIEIRA JÚNIOR, Gerardo Magela; FARIAS, Ruth Raquel Soares de; CHAVES, Mariana Helena. COMPOSIÇÃO QUÍMICA, FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE *Simaba ferruginea*. **Estudos Interdisciplinares nas Ciências Exatas e da Terra e Engenharias 4**, [S.L.], p. 144-156, 11 set. 2019. Atena Editora. <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.22519110915>.

OLIVEIRA, Marília Santini de; MATOS, Aline da Rocha; Siqueira, Marilda Agudo Mendonça Teixeira de. Conhecendo o Sars-CoV-2 e a Covid-19. In: BUSS, Paulo M.; FONSECA, Luiz Eduardo (org.). Diplomacia da saúde e Covid-19: reflexões a meio caminho. Rio de Janeiro: Observatório Covid-19 Fiocruz; **Editora Fiocruz**, 2020. p. 69-82. ISBN 978-65-5708-029-0. (Série Informação para Ação na Covid-19).

OLIVEIRA, Patricia Sertão; MÜLLER, Regina Celi Sarkis; DANTAS, Kelly das Graças Fernandes; ALVES, Claudio Nahum; VASCONCELOS, Marcus Arthur Marçal de; VENTURIERI, Giorgio Cristino. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 1728-1732, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012000900005>.

PANYA, Aussara; JANTAKEE, Kanyaluck; PUNWONG, Suthida; THONGYIM, Supawadee; KAEWKOD, Thida; YENCHITSOMANUS, Pa-Thai; TRAGOOLPUA, Yingmanee; PANDITH, Hataichanok. Triphala in Traditional Ayurvedic Medicine Inhibits Dengue Virus Infection in Huh7 Hepatoma Cells. **Pharmaceuticals**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 1-18, 28 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ph14121236>.

PARASHER, Anant. COVID-19: current understanding of its pathophysiology, clinical presentation and treatment. **Postgraduate Medical Journal**, [S.L.], v. 97, n. 1147, p. 312-320, 25 set. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138577>.

PATEL, Ashish; RAJENDRAN, Malathi; SHAH, Ashish; PATEL, Harnisha; PAKALA, Suresh B.; KARYALA, Prashanthi. Virtual screening of curcumin and its analogs against the spike surface glycoprotein of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [S.L.], v. 40, n. 11, p. 5138-5146, 5 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1868338>.

PATIL, Vishal S.; HARISH, Darasaguppe R.; VETRIVEL, Umashankar; ROY, Subarna; DESHPANDE, Sanjay H.; HEGDE, Harsha V.. Hepatitis C Virus NS3/4A Inhibition and Host Immunomodulation by Tannins from Terminalia chebula: a structural perspective. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 1076, 5 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27031076>.

PAVIA, Donald L.; LAMPAM, Gary M.; KRIZ, Georg S.; VYVYAN, James R.. **Introdução a espectroscopia**. 4. ed. Washington: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PEREIRA, Rosângela Santos; COSTA, Vivian Vasconcelos; GOMES, Gabriel Luiz Menezes; CAMPANA, Priscilla Rodrigues Valadares; PÁDUA, Rodrigo Maia de; BARBOSA, Milton; OKI, Yumi; HEIDEN, Gustavo; FERNANDES, Geraldo Wilson; OLIVEIRA, Djalma Menezes de. Anti-ZikaVirus Activity of Plant Extracts Containing Polyphenols and Triterpenes on Vero CCL-81 and Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. **Chemistry & Biodiversity**, [S.L.], v. 19, n. 4, p. 1-15, 24 mar. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.202100842>.

PERERA, W. P. R. T.; LIYANAGE, Janitha A.; DISSANAYAKE, K. G. C.; GUNATHILAKA, Hiruni; WEERAKOON, W. M. T. D. N.; WANIGASEKARA, D. N.; FERNANDO, W. S. K.; RAJAPAKSHA, R. M. H.; LIYANAGE, R. P.; PERERA, Bingun T.. Antiviral Potential of Selected Medicinal Herbs and Their Isolated Natural Products. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2021, p. 1-18, 8 dez. 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/7872406>.

PERLMAN, Stanley; WHEELER, D. Lori. Neurotropic Coronavirus Infections. **Neurotropic Viral Infections**, [S.L.], p. 115-148, 2016. Springer International Publishing. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-33133-1\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-33133-1_5).

PHILLIPS, Judith M.; WEISS, Susan R.. Pathogenesis of neurotropic murine coronavirus is multifactorial. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 2-7, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.11.001>.

PINGALI, Usharani; SUKUMARAN, Deepasree; NUTALAPATI, Chandrasekhar. Effect of an aqueous extract of Terminalia chebula on endothelial dysfunction, systemic inflammation, and lipid profile in type 2 diabetes mellitus: a randomized double-blind, placebo-controlled clinical study. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 3226-3235, 2 jul. 2020. Wiley..

PITIPORN, Supaporn; CHAOPREECHA, Jarinya. Anti-SARS-CoV-2 Activity of Andrographis paniculata Extract and Its Major Component Andrographolide in Human Lung Epithelial Cells and Cytotoxicity Evaluation in Major Organ Cell Representatives. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 1261-1270, 12 abr. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01324>.

POPE, M; ROTSTEIN, O; COLE, E; SINCLAIR, S; PARR, R; CRUZ, B; FINGEROTE, R; CHUNG, S; GORCZYNSKI, R; FUNG, L. Pattern of disease after murine hepatitis virus strain 3 infection correlates with macrophage activation and not viral replication. **Journal Of**

**Virology**, [S.L.], v. 69, n. 9, p. 5252-5260, set. 1995. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.69.9.5252-5260.1995>.

PRASAD, Ashish; MUTHAMILARASAN, Mehanathan; PRASAD, Manoj. Synergistic antiviral effects against SARS-CoV-2 by plant-based molecules. **Plant Cell Reports**, [S.L.], v. 39, n. 9, p. 1109-1114, 19 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-020-02560-w>.

PRIYA, S.; KUMAR, Nachimuthu Senthil; HEMALATHA, S.. Antiviral phytochemicals target envelop protein to control Zikavirus. **Computational Biology And Chemistry**, [S.L.], v. 77, p. 402-412, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.08.008>.

RAJ, Vinit; LEE, Jin-Hyung; SHIM, Jae-Jin; LEE, Jintae. Antiviral activities of 4H-chromen-4-one scaffold-containing flavonoids against SARS-CoV-2 using computational and in vitro approaches. *Journal Of Molecular Liquids*, [S.L.], v. 353, p. 118775, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118775>.

RAO G. Subba; SINSHEIMER, Joseph E.; COCHRAN, Kenneth W.. Antiviral activity of triterpenoid saponins containing acylated  $\beta$ -amyrin aglycones. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 471-473, mar. 1974. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600630341>.

REN; LL, Wang YM, Wu ZQ, Xiang ZC, Guo L, Xu T, Jiang YZ, Xiong Y, Li YJ, Li XW, Li H, Fan GH, Gu XY, Xiao Y, Gao H, Xu JY, Yang F, Wang XM, Wu C, Chen L, Liu YW, Liu B, Yang J, Wang XR, Dong J, Li L, Huang CL, Zhao JP, Hu Y, Cheng ZS, Liu LL, Qian ZH, Qin C, Jin Q, Cao B, Wang JW. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in humans: a descriptive study. **Chin Med J (Engl)**. 5 de maio de 2020;133(9):1015-1024. doi: 10.1097/CM9.0000000000000722. PMID: 32004165; PMCID: PMC7147275.

RIET, F. de St. J.; KAHN, L. B.. Isolation of a murine hepatitis virus from Swiss mice treated with antilymphocyte serum. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 1-8, mar. 1973. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01250502>.

ROCHA, Marina P.; CAMPANA, Priscilla R. V.; PÁDUA, Rodrigo M.; SOUZA FILHO, José D.; FERREIRA, Daneel; BRAGA, Fernão C..(3,3'')-Linked Biflavanones from *Ouratea spectabilis* and Their Effects on the Release of Proinflammatory Cytokines in THP-1 Cells. **Journal Of Natural Products**, [S.L.], v. 83, n. 6, p. 1891-1898, 2 jun. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00007>.

ROMERO-BENAVIDES, Juan Carlos; ATIENCIE-VALAREZO, Nora Cecilia; DUARTE-CASAR, Rodrigo. Flavonoid Composition and Antioxidant Activity of *Tragia volubilis* L. Methanolic Extract. *Plants*, [S.L.], v. 12, n. 17, p. 3139, 31 ago. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants12173139>.

ROMERO-BENAVIDES, Juan Carlos; ORTEGA-TORRES, Gina C.; VILLACIS, Javier; VIVANCO-JARAMILLO, Sara L.; GALARZA-URGILÉS, Karla I.; BAILON-MOSCOSO, Natalia. Phytochemical Study and Evaluation of the Cytotoxic Properties of Methanolic Extract from *Baccharis obtusifolia*. **International Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 2018, p. 1-5, 1 ago. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/8908435>.

SAHIN, Ahmet Riza. 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Outbreak: a review of the current literature. **Eurasian Journal Of Medicine And Oncology**, [S.L.], p. 1-8, 2020. Kare Publishing. <http://dx.doi.org/10.14744/ejmo.2020.12220>.

SALZBERGER, Bernd; BUDER, Felix; LAMPL, Benedikt; EHRENSTEIN, Boris; HITZENBICHLER, Florian; HOLZMANN, Thomas; SCHMIDT, Barbara; HANSES, Frank. Epidemiology of SARS-CoV-2. **Infection**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 233-239, 8 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-020-01531-3>.

SAND, Lukas van de; BORMANN, Maren; ALT, Mira; SCHIPPER, Leonie; HEILINGLOH, Christiane Silke; STEINMANN, Eike; TODT, Daniel; DITTMER, Ulf; ELSNER, Carina; WITZKE, Oliver. Glycyrrhizin Effectively Inhibits SARS-CoV-2 Replication by Inhibiting the Viral Main Protease. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 609, 2 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v13040609>.

SANTANA, Gracielle Silva. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA BIOGUIADA PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Erythroxylum mucronatum* Benth. (ERYTHROXYLACEAE)**. 2018. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, 2018. Disponível em: [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/7603/2/GRACIELLE\\_SILVA\\_SANTANA.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/7603/2/GRACIELLE_SILVA_SANTANA.pdf). Acesso em: 15 out. 2024.

SANTOS, Flávia Almeida; FROTA, Julyanne Torres; ARRUDA, Bruno Rodrigues; MELO, Tiago Sousa de; SILVA, Armenio André de Carvalho Almeida da; BRITO, Gerly Anne de Castro; CHAVES, Mariana Helena; RAO, Vietla Satyanarayana. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. **Lipids In Health And Disease**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-8, 6 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-511x-11-98>.

SARKAR, Arkaniva; AGARWAL, Rushali; BANDYOPADHYAY, Boudhayan. Molecular docking studies of phytochemicals from *Terminalia chebula* for identification of potential multi-target inhibitors of SARS-CoV-2 proteins. **Journal Of Ayurveda And Integrative Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 100557, abr. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaim.2022.100557>.

SARMA, Jayasri das. A Mechanism of Virus-Induced Demyelination. **Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases**, [S.L.], v. 2010, p. 1-28, 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/109239>.

SCIALO, Filippo; DANIELE, Aurora; AMATO, Felice; PASTORE, Lucio; MATERA, Maria Gabriella; CAZZOLA, Mario; CASTALDO, Giuseppe; BIANCO, Andrea. ACE2: the major cell entry receptor for sars-cov-2. **Lung**, [S.L.], v. 198, n. 6, p. 867-877, 10 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>.

SHALDAM, Moataz A.; YAHYA, Galal; MOHAMED, Nashwa H.; ABDEL-DAIM, Mohamed M.; NAGGAR, Yahya Al. In silico screening of potent bioactive compounds from honeybee products against COVID-19 target enzymes. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 28, n. 30, p. 40507-40514, 2 maio 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-021-14195-9>.

SHARMA, Niti; TAN, Mario A.; AN, Seong Soo A.. Phytosterols: potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 22, p. 12255, 12 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212255>.

SHEHU, Abdullahi; PONNAPALLI, Mangala Gowri; MAHBOOB, M.; PRABHAKAR, P. V.; OLATUNJI, Gabriel Ademola. New n-nonadecanoyl- $\beta$ -sitosterol and other constituents from the stem-bark of *Anacardium occidentale*. **Natural Product Research**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 1357-1363, 9 ago. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2019.1650353>.

SHOHAN, Mojtaba; NASHIBI, Roohangiz; MAHMOUDIAN-SANI, Mohammad-Reza; ABOLNEZHADIAN, Farhad; GHAFOURIAN, Mehri; ALAVI, Seyed Mohammad; SHARHANI, Asaad; KHODADADI, Ali. The therapeutic efficacy of quercetin in combination with antiviral drugs in hospitalized COVID-19 patients: a randomized controlled trial. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 914, p. 174615, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174615>.

SHUKOR, Nadin Al; VAN CAMP, John; GONZALES, Gerard Bryan; STALJANSSENS, Dorien; STRUIJS, Karin; ZOTTI, Moises J.; RAES, Katleen; SMAGGHE, Guy. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Effects by Plant Phenolic Compounds: a study of structure activity relationships. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 61, n. 48, p. 11832-11839, 21 nov. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf404641v>.

SILVA, Matheus L.; OLIVEIRA, Cyntia S.; SANTOS, Wagner J. O. dos; OLIVEIRA, Vani X.; ANTAR, Guilherme M.; LAGO, João H. G.; CERCHIARO, Giselle. Selective cytotoxicity of ent-kaurene diterpenoids isolated from *Baccharis lateralis* and *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Archiv Der Pharmazie**, [S.L.], v. 355, n. 8, p. 2200083, 12 maio 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ardp.202200083>.

SILVA, Pâmela S.; VICCINI, Lyderson F.; SINGULANI, Junya L.; SIQUEIRA, Ezequias Pessoa de; ZANI, Carlos L.; ALVES, Tânia M. A.. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**,

[S.L.], v. 20, n. 6, p. 843-849, dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2010005000040>.

SILVA, Taynara Lopes. **“ESTUDO QUÍMICO DE BOWDICHIA VIRGILIOIDES (FABACEAE) NA BUSCA DE INIBIDORES SELETIVOS DE CISTEÍNO PEPTIDASES**. 2014. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2014.

ŞİMŞEK-Yavuz S, KOMSUOĞLU Çelikyurt FI. Uma atualização do tratamento antiviral do COVID-19. **Turk J Med Sci**. 2021 Dez 17;51(SI-1):3372-3390. doi: 10.3906/sag-2106-250. PMID: 34391321; PMCID: PMC8771049.

SINGH, Geeta; KUMAR, Padma. Extraction, gas chromatography-mass spectrometry analysis and screening of fruits of Terminalia chebula Retz. for its antimicrobial potential. **Pharmacognosy Research**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 162, 2013. EManuscript Technologies. <http://dx.doi.org/10.4103/0974-8490.112421>.

SOLOVAROV, Innokentii; KHASNATINOV, Maxim; SHISHLYANNIKOVA, Tatyana; LYAPUNOVA, Natalie; DANCHINOVA, Galina. Fractionating the Plant Extract in Mini Volumes to Purify the Potential Antivirals from Terminalia Chebula. **International Journal Of Biomedicine**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 57-60, 15 mar. 2019. International Medical Research and Development Corporation. [http://dx.doi.org/10.21103/article9\(1\)\\_oa11](http://dx.doi.org/10.21103/article9(1)_oa11).

SOUSA, Elcilene A. de; SILVA, Armenio A. C. A. da; CAVALHEIRO, Alberto J.; LAGO, João Henrique G.; CHAVES, Mariana H.. A New Flavonoid Derivative from Leaves of Oxandra sessiliflora R. E. Fries. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 704-708, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140023>.

SOUZA, Michele Trombin de; SOUZA, Mireli Trombin de; BERNARDI, Daniel; MELO, Douglas José de; ZARBIN, Paulo Henrique Gorgatti; ZAWADNEAK, Maria Aparecida Cassilha. Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils of Baccharis spp. and histological assessment against Drosophila suzukii (Diptera: drosophilidae). **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-15, 17 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-83557-7>.

SRINIVASAN, Vasundara; BROGNARO, Hévila; PRABHU, Prince R.; SOUZA, Edmarcia Elisa de; GÜNTHER, Sebastian; REINKE, Patrick Y. A.; LANE, Thomas J.; GINN, Helen; HAN, Huijong; EWERT, Wiebke. Antiviral activity of natural phenolic compounds in complex at an allosteric site of SARS-CoV-2 papain-like protease. **Communications Biology**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 1-12, 11 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-022-03737-7>.

SRIRAMAN, Sandhiya; RAMANUJAM, Ganesh Munuswamy; RAMASAMY, Mohankumar; DUBEY, Govind Prasad. Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in Bambusa bambos (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect in vitro. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [S.L.], v. 115, p. 55-61, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.024>.

SUBRAMANIAM, Saravanan; SUBRAMANIAM, Ramachandran; RAJAPANDIAN, Suja; UTHRATHI, Subasini; GNANAMANICKAM, Victor Rajamanickam; DUBEY, Govinda Prasad. Anti-Atherogenic Activity of Ethanolic Fraction of Terminalia arjuna Bark on Hypercholesterolemic Rabbits. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2011, p. 1-8, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neq003>.

SUEDEE, Areerat; TEWTRAKUL, Supinya; PANICHAYUPAKARANANT, Pharkphoom. Anti-HIV-1 integrase compound from Pometia pinnata leaves. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 51, n. 10, p. 1256-1261, 11 jul. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2013.786098>.

TANG, Jie; DIAO, Ping; SHU, Xiaohong; LI, Li; XIONG, Lidan. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: in vitro assessment and a theoretical model. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2019, p. 1-8, 28 out. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/7039802>.

TOUJANI, Marwa Mekni; RITTÀ, Massimo; CIVRA, Andrea; GENOVESE, Salvatore; EPIFANO, Francesco; GHRAM, Abdeljelil; LEMBO, David; DONALISIO, Manuela. Inhibition of HSV-2 infection by pure compounds from Thymus capitatus extract in vitro. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 32, n. 8, p. 1555-1563, 19 abr. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6084>.

TOLARDO, Aline Lavado. **Pesquisa de compostos com potencial ação antiviral para o vírus Mayaro e Oropouche**. 2019. 61 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-13042020-135944/publico/AlineLavadoTolardo.pdf>. Acesso em: 04 maio 2024.

TSHIKALANGE, T. E.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; MUÑOZ, E.; SANCHO, R.; VAN DE VENTER, M.; OOSTHUIZEN, V. *In vitro* anti-HIV-1 properties of ethnobotanically selected South African plants used in the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 478-481, 2008.

UMAR, Abd. Kakhar; ZOTHANTLUANGA, James H.; ASWIN, Keerthic; MAULANA, Saipul; ZUBAIR, Muhammad Sulaiman; LALHLENMAWIA, H.; RUDRAPAL, Mithun; CHETIA, Dipak. Antiviral phytochemicals “ellagic acid” and “(+)-sesamin” of Bridelia retusa identified as potential inhibitors of SARS-CoV-2 3CL pro using extensive molecular docking, molecular dynamics simulation studies, binding free energy calculations, and bioactivity

prediction. **Structural Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 5, p. 1445-1465, 10 maio 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11224-022-01959-3>.

UTSUNOMIYA, Hirotohi; ICHINOSE, Masao; IKEDA, Keiko; UOZAKI, Misao; MORISHITA, Junko; KUWAHARA, Tomomi; KOYAMA, A. Hajime; YAMASAKI, Hisashi. Inhibition by caffeic acid of the influenza A virus multiplication in vitro. **International Journal Of Molecular Medicine**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 1020-1024, 22 jul. 2014. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1859>.

VALSARAJ, R.; PUSHPANGADAN, P.; SMITT, U. W.; ADSERSEN, A.; S. B.; SITTE, A.; NYMAN, U.; NIELSEN, C.; OLSEN, C. E. New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 7, p. 739-742, 1997.

VECHIA, C.A.D.; MORAIS, B.; SCHONELL, A.P.; DIEL, K.A.P.; FAUST, C.; MENIN, C.; GOMES, D.B.; ROMAN JUNIOR, W.A.. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 288-296, 2016. FapUNIFESP (SciELO). [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15\\_128](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/15_128).

VICHAJ, V; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 1, n. 3, p. 1112-1116, ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>.

VIET, Tran Duc; XUAN, Tran Dang; ANH, La Hoang.  $\alpha$ -Amyrin and  $\beta$ -Amyrin Isolated from *Celastrus hindsii* Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 23, p. 7248, 29 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26237248>.

VIET, Tran Duc; XUAN, Tran Dang; ANH, La Hoang.  $\alpha$ -Amyrin and  $\beta$ -Amyrin Isolated from *Celastrus hindsii* Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 23, p. 7248, 29 nov. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26237248>.

WAGNER, H. & BLADT, S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. **2nd Edition**, Springer-Verlag, Berlin, 1996.

Wang SC, Chen Y, Wang YC, Wang WJ, Yang CS, Tsai CL, Hou MH, Chen HF, Shen YC, Hung MC. O ácido tânico suprime o SARS-CoV-2 como um inibidor duplo da protease principal viral e da protease TMPRSS2 celular. **Sou J Câncer Res**. 2020 1º dez; 10(12):4538-4546. PMID: 33415017; PMCID: PMC7783773.

WANG, Gui-Feng; SHI, Li-Ping; REN, Yu-Dan; LIU, Qun-Fang; LIU, Hou-Fu; ZHANG, Ru-Jun; LI, Zhuang; ZHU, Feng-Hua; HE, Pei-Lan; TANG, Wei. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 83, n.2, p. 186-190, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.05.0>.

WANG, Wei; CHEN, Wei; YANG, Yingshi; LIU, Tianxing; YANG, Haiyan; XIN, Zhihong. New Phenolic Compounds from *Coreopsis tinctoria* Nutt. and Their Antioxidant and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activities. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 200-207, 30 dez. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf504289g>.

WEISS, Susan R.; LEIBOWITZ, Julian L.. Coronavirus Pathogenesis. **Advances In Virus Research**, [S.L.], p. 85-164, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-385885-6.00009-2>.

WIERSINGA, W. Joost; RHODES, Andrew; CHENG, Allen C.; PEACOCK, Sharon J.; PRESCOTT, Hallie C.. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Jama**, [S.L.], v. 324, n. 8, p. 782, 25 ago. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2020.12839>.

WOO, Patrick C. Y.; LAU, Susanna K. P.; HUANG, Yi; YUEN, Kwok-Yung. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. **Experimental Biology And Medicine**, [S.L.], v. 234, n. 10, p. 1117-1127, out. 2009. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.3181/0903-mr-94>.

WOODBY, Brittany; ARNOLD, Michelle M.; VALACCHI, Giuseppe. SARS-CoV-2 infection, COVID-19 pathogenesis, and exposure to air pollution: what is the connection?. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 1486, n. 1, p. 15-38, 6 out. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.14512>.

XIAO, Sulong; TIAN, Zhenyu; WANG, Yufei; SI, Longlong; ZHANG, Lihe; ZHOU, Demin. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. **Medicinal Research Reviews**, [S.L.], v. 38, n. 3, p. 951-976, 19 jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/med.21484>.

YANG, Jinfeng; JIANG, Wenxuan; PARK, Ju Hee; SEONG, Eun Soo; KWON, Yong Soo; KIM, Myong Jo. Antioxidant and Pancreatic Lipase Inhibitory Activities of *Panax japonicus* (T. Nees) C.A. Meyer. **Plants**, [S.L.], v. 14, n. 13, p. 2003, 30 jun. 2025. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants14132003>.

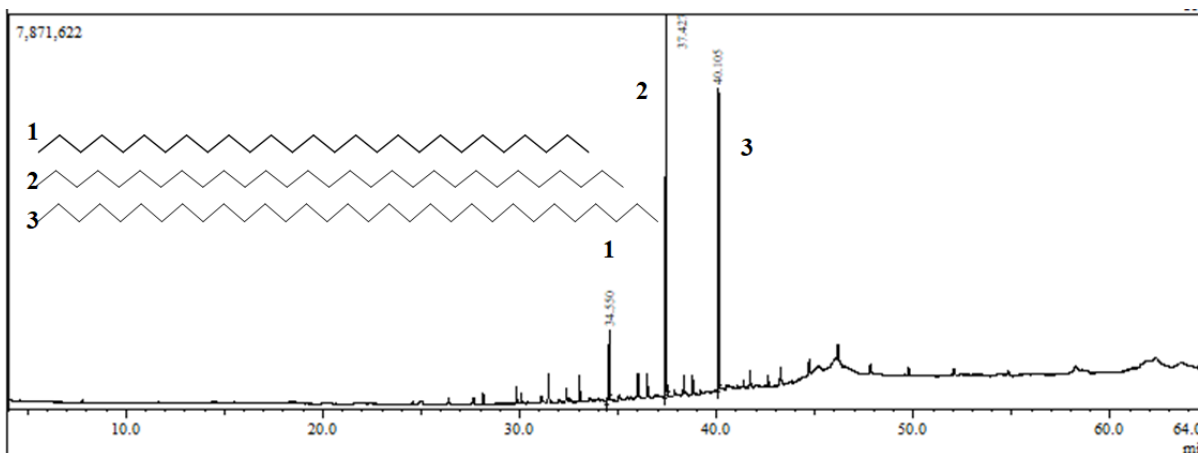
YESUDHAS, Dhanusha; SRIVASTAVA, Ambuj; GROMIHA, M. Michael. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. **Infection**, [S.L.], v. 49, n. 2, p. 199-213, 4 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-020-01516-2>.

ZHANG, Xiao-Rui; KAUNDA, Joseph Sakah; ZHU, Hong-Tao; WANG, Dong; YANG, Chong-Ren; ZHANG, Ying-Jun. The Genus *Terminalia* (Combretaceae): an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. **Natural Products And Bioprospecting**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 357-392, 6 nov. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13659-019-00222-3>.

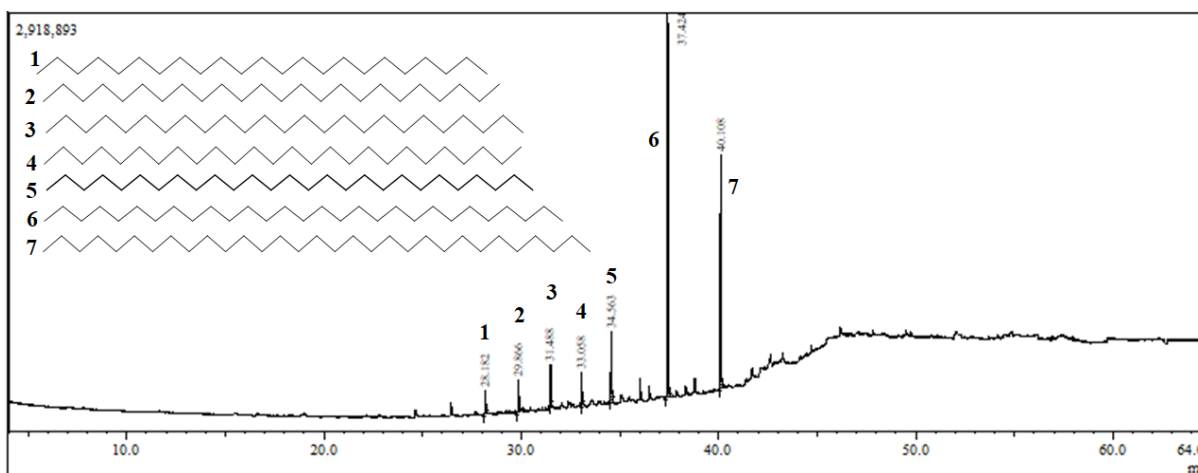
ZHOU, Bei-Xian; LI, Jing; LIANG, Xiao-Li; PAN, XI-Ping; HAO, Yan-Bing; XIE, Pei-Fang; JIANG, Hai-Ming; YANG, Zi-Feng; ZHONG, Nan-Shan.  $\beta$ -sitosterol ameliorates influenza A virus-induced proinflammatory response and acute lung injury in mice by disrupting the cross-talk between RIG-I and IFN/STAT signaling. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 1178-1196, 5 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0403-9>.

ZIENIUK, Bartłomiej; BIAECKA-FLORJACZYK, Ewa; WIERZCHOWSKA, Katarzyna; FABISZEWSKA, Agata. Recent advances in the enzymatic synthesis of lipophilic antioxidant and antimicrobial compounds. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 1-16, 7 dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-021-03200-5>.

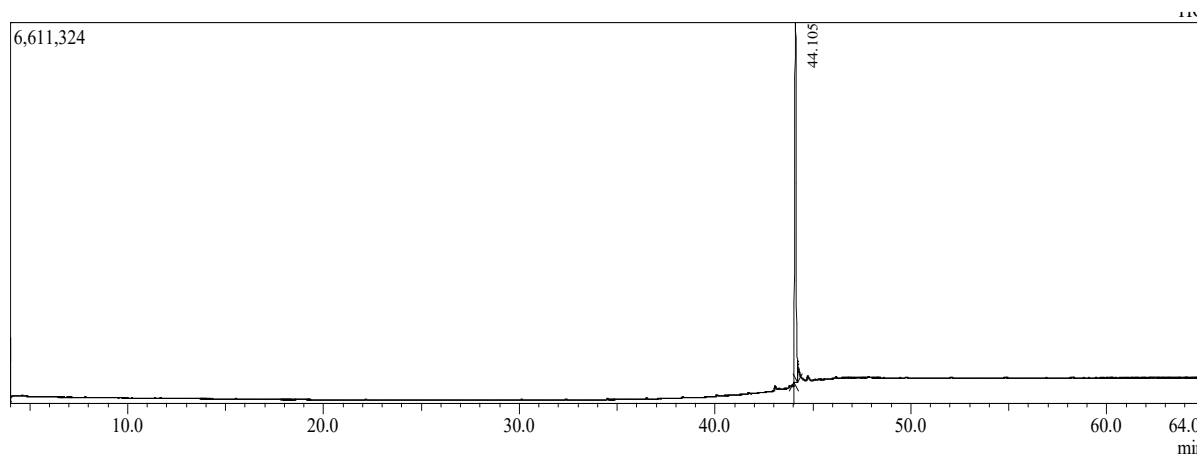
## APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS



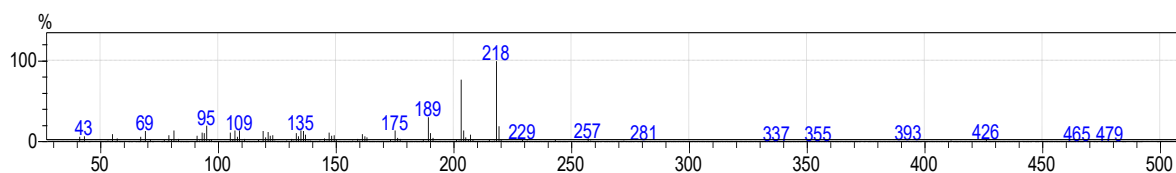
**Figura 69:** Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de GFJ10. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.21.5. Compostos: 1= heptacosano; 2 = nonacosano; 3= hentriacontano.



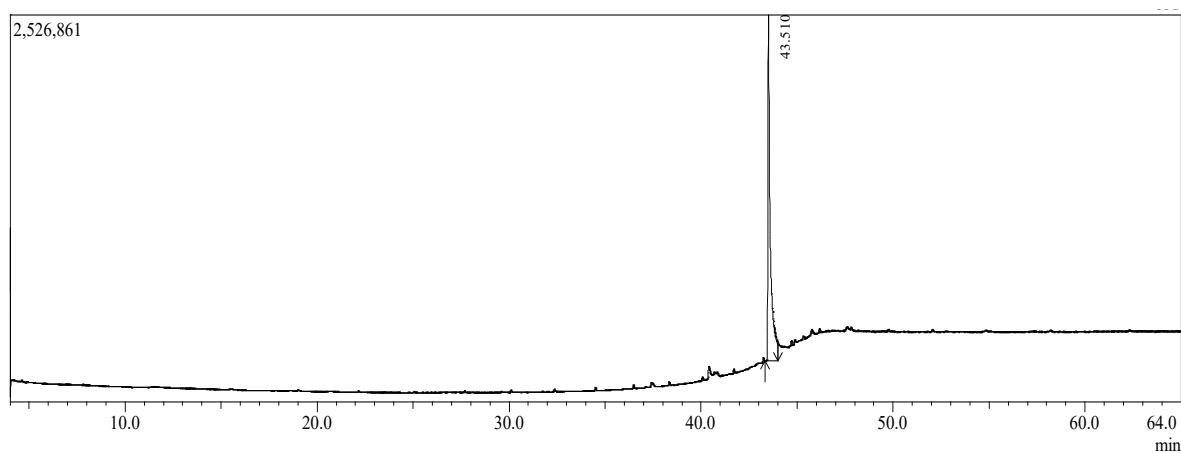
**Figura 70:** Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de GFJ12. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.21.5. Compostos: 1= tricosano; 2 = tetacosano; 3=pentacosano; 4= hexacosano; 5=heptacosano; 6= nonacosano; 7= hentriacontano.



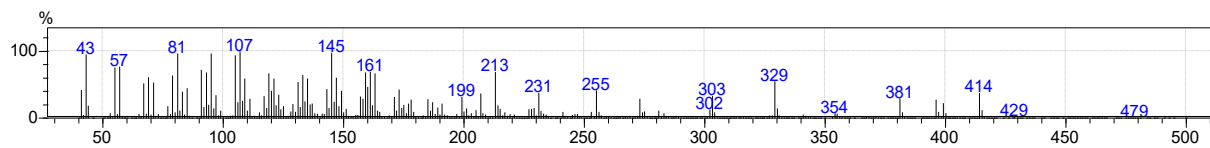
**Figura 71:** Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de RFJ900. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.21.5. Composto:  $\beta$ -amirina.



**Figura 72:** Espectro de massas obtido por GC-MS de RFJ900. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.21.5. Composto:  $\beta$ -amirina.

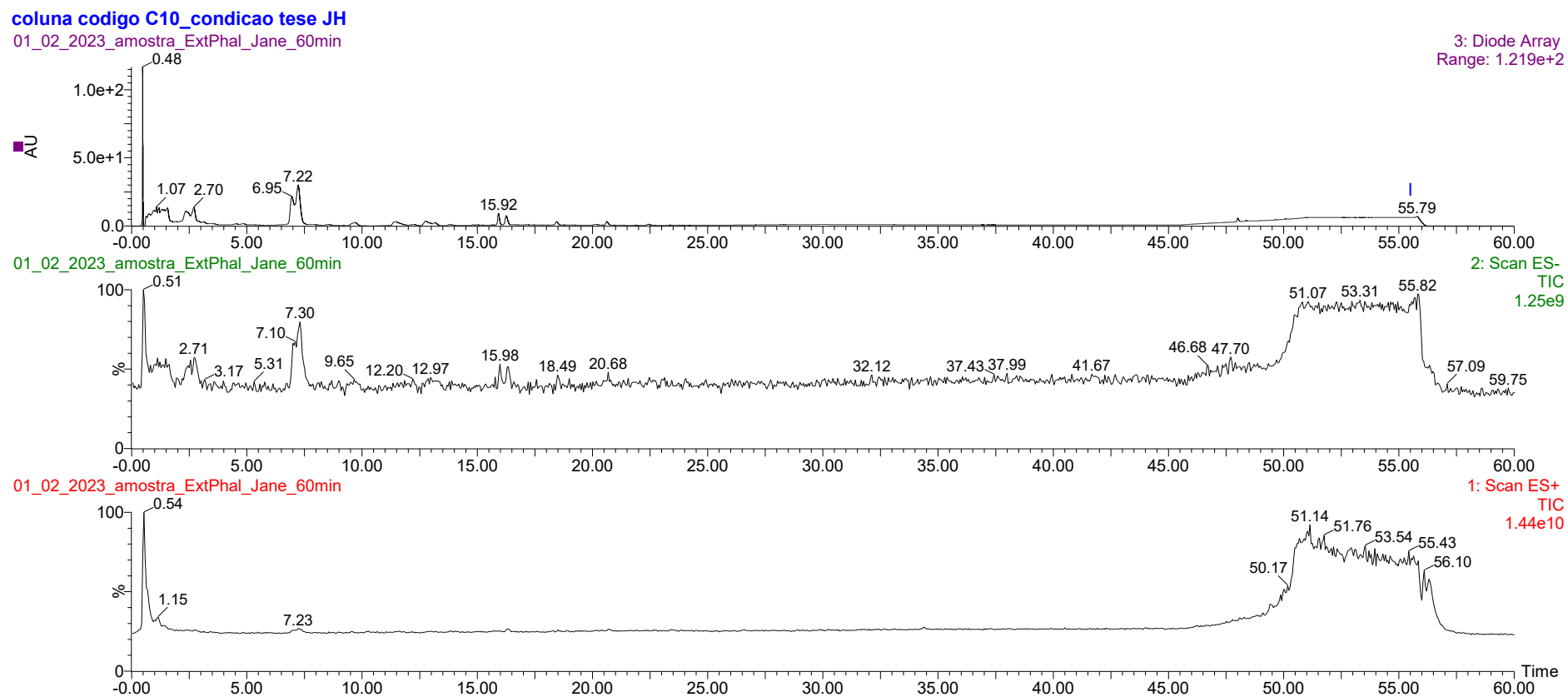


**Figura 73:** Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por GC-MS de RFJ1135. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.21.5. Composto:  $\beta$ -sitosterol.

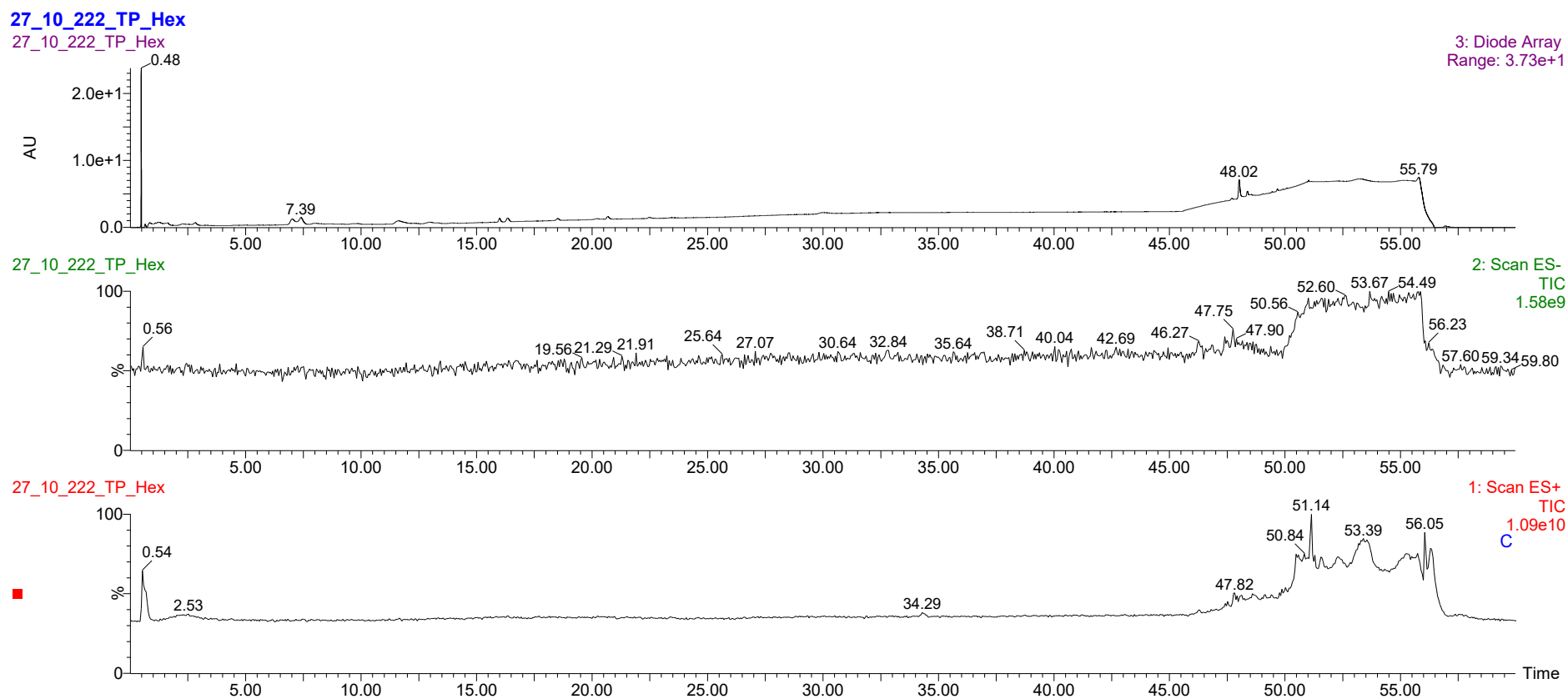


**Figura 74:** Espectro de massas obtido por GC-MS de RFJ1135. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.21.5. Composto:  $\beta$ -sitosterol.

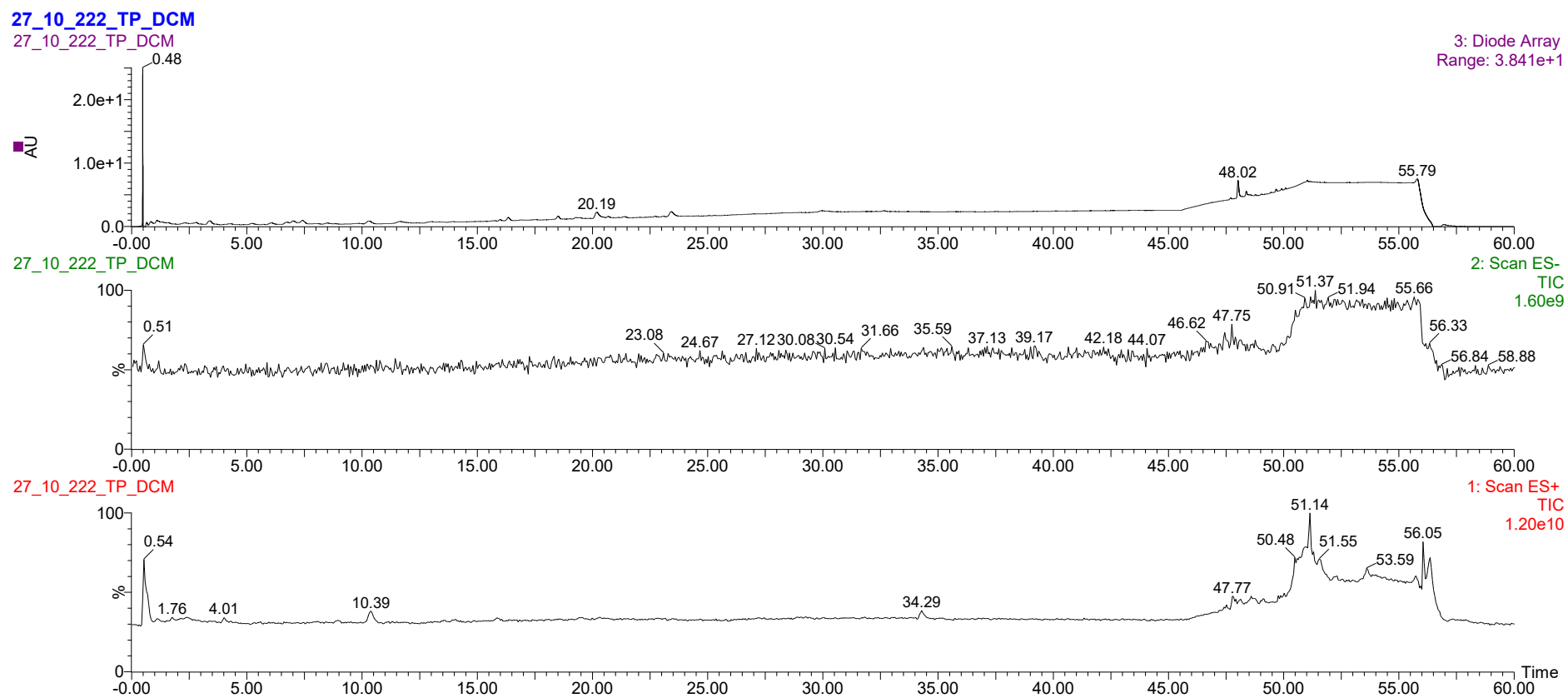
## APÊNDICE B - Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS



**Figura 75:** Cromatogramas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS para o extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no UV (roxo). No cromatograma foram registrados picos com  $t_r = 0,48$  (a),  $t_r = 1,07$  (b),  $t_r = 2,70$  (c),  $t_r = 6,95$  (d),  $t_r = 7,22$  (e),  $t_r = 15,92$  (f),  $t_r = 16,42$  (g),  $t_r = 48,01$  (h),  $t_r = 55,79$  (i).



**Figura 76:** Cromatograma obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a fração *n*-hexânica de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV e por MS nos modos de ionização (b) negativo (ESI-) e (c) positivo (ESI+).



**Figura 77:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para a fração DCM de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV e por MS nos modos de ionização (b) negativo (ESI-) e (c) positivo (ESI+).

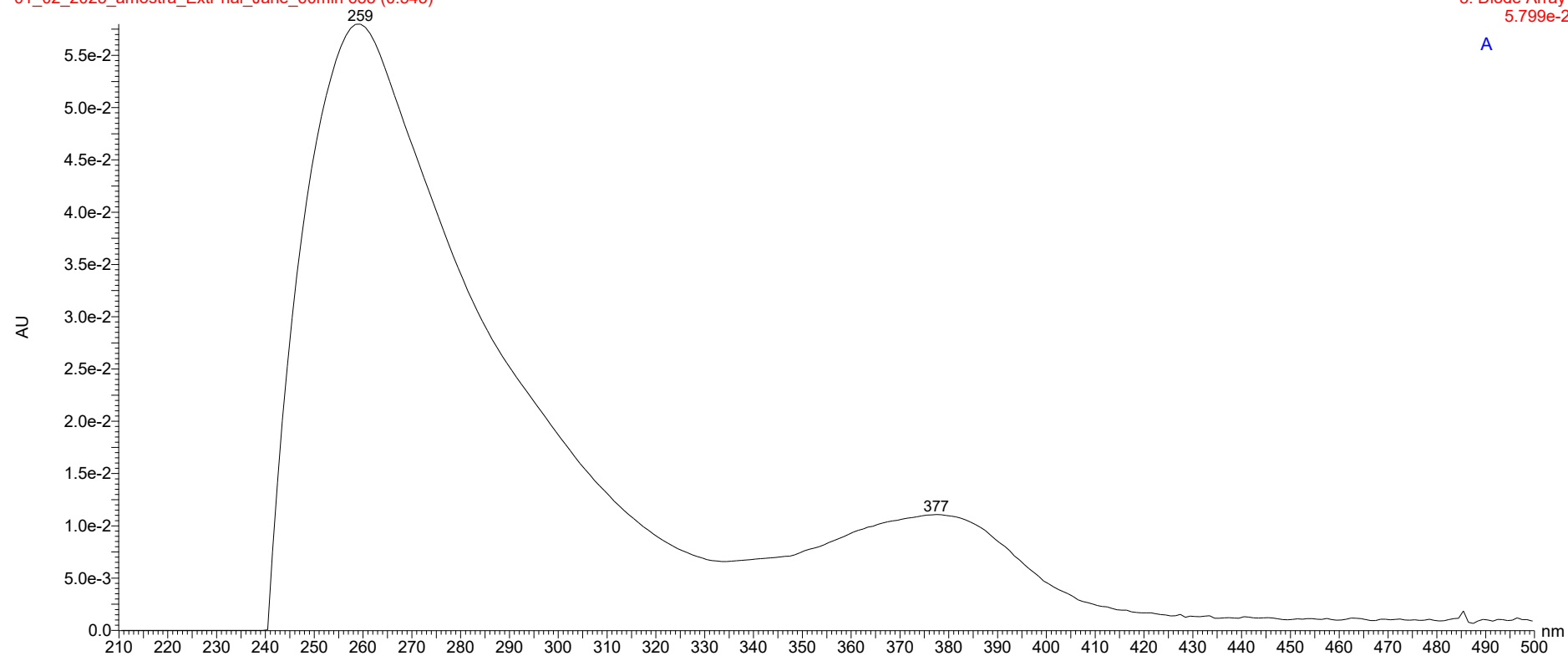
## APÊNDICE C - Espectros obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS/MS

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 653 (0.543)

3: Diode Array  
5.799e-2

A



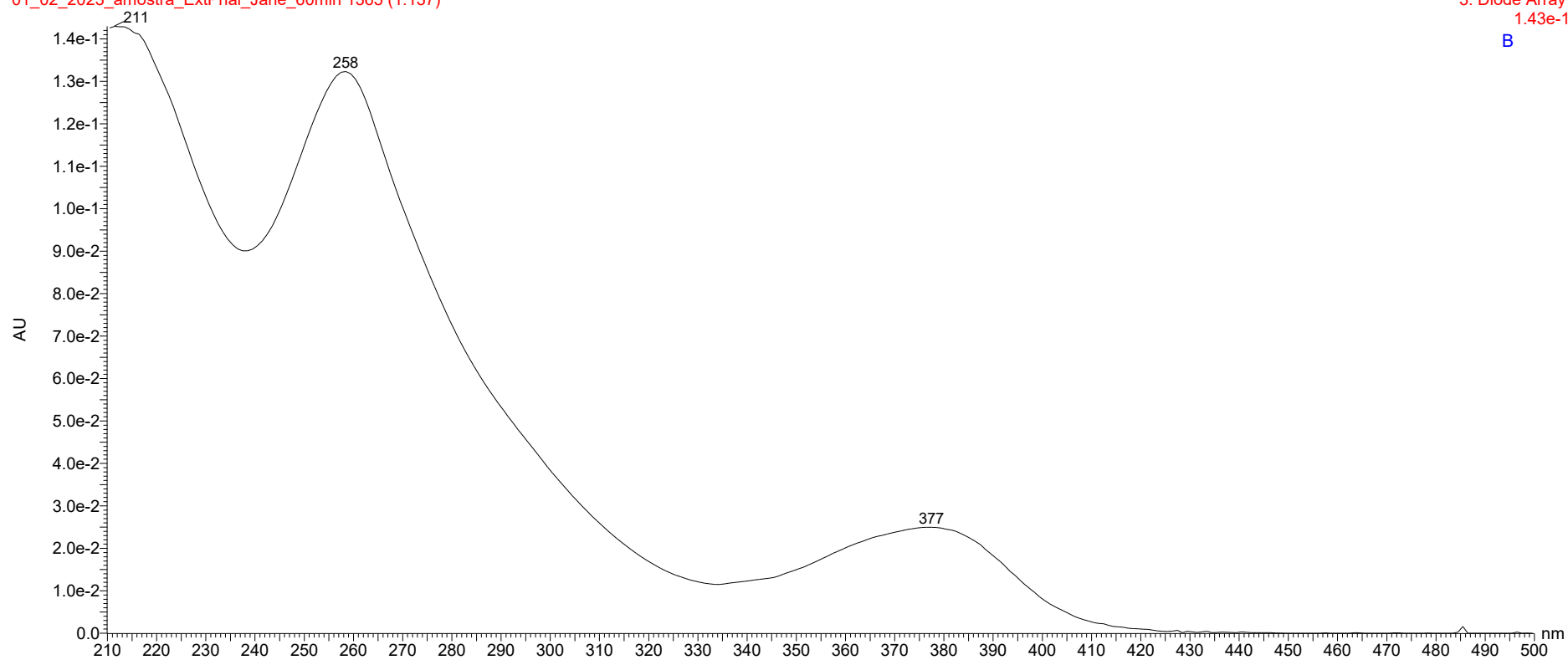
**Figura 78:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico A do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 259 e 377 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 1365 (1.137)

3: Diode Array  
1.43e-1

B



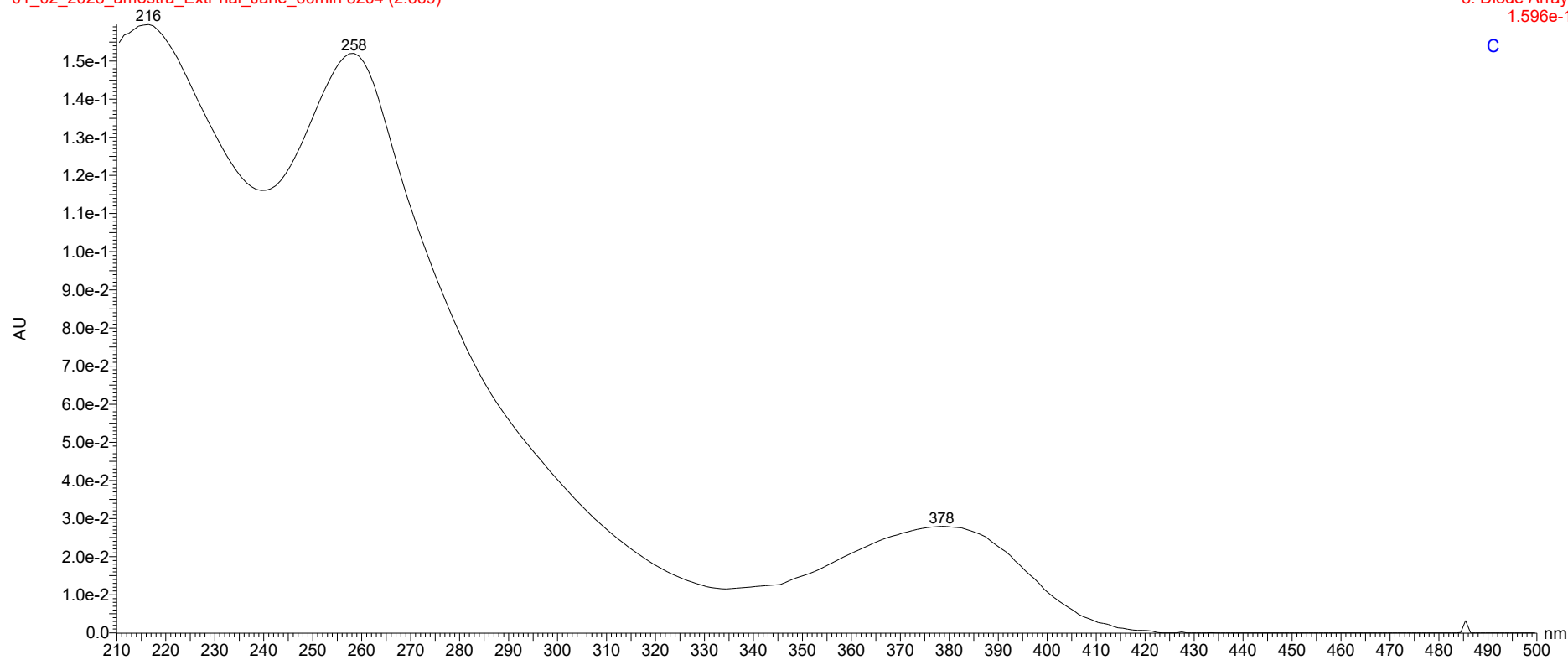
**Figura 79:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico B do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 258 e 377 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 3204 (2.669)

3: Diode Array  
1.596e-1

C



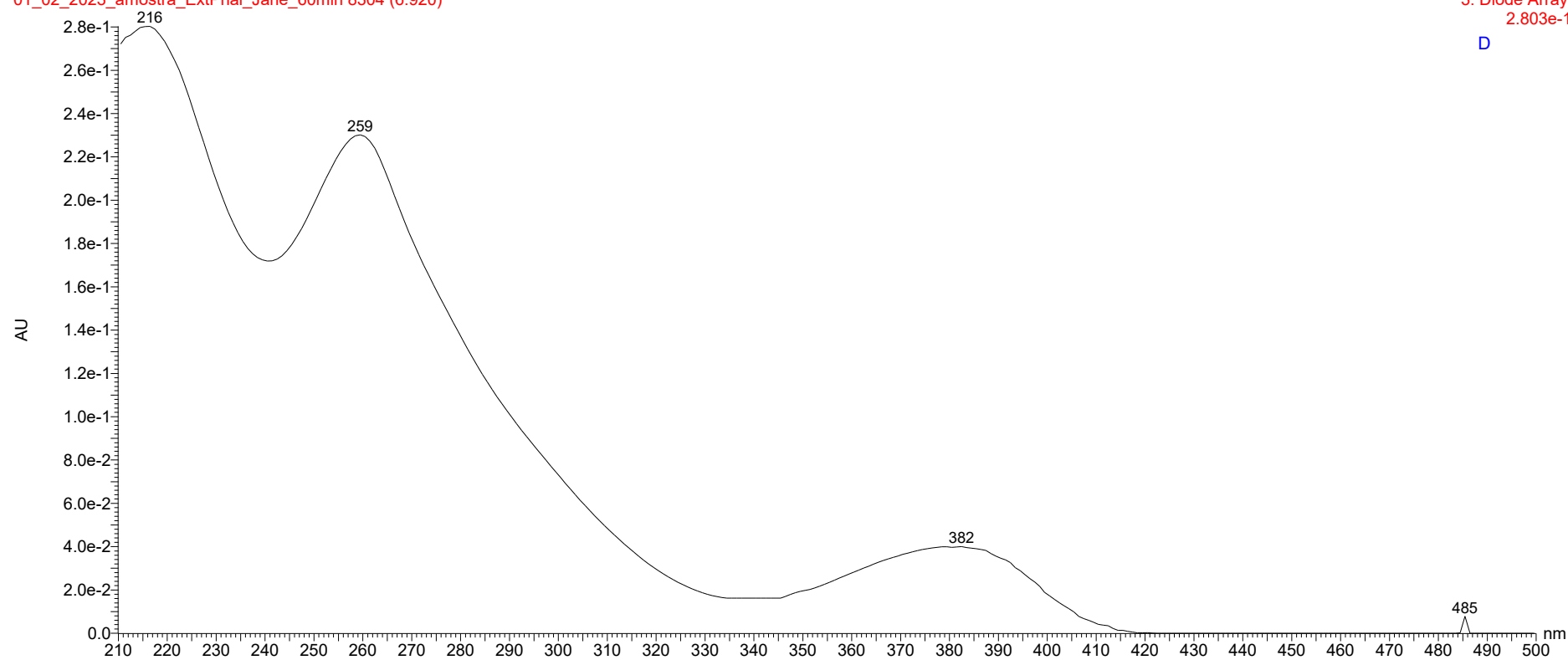
**Figura 80:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico C do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 258 e 378 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 8304 (6.920)

3: Diode Array  
2.803e-1

D

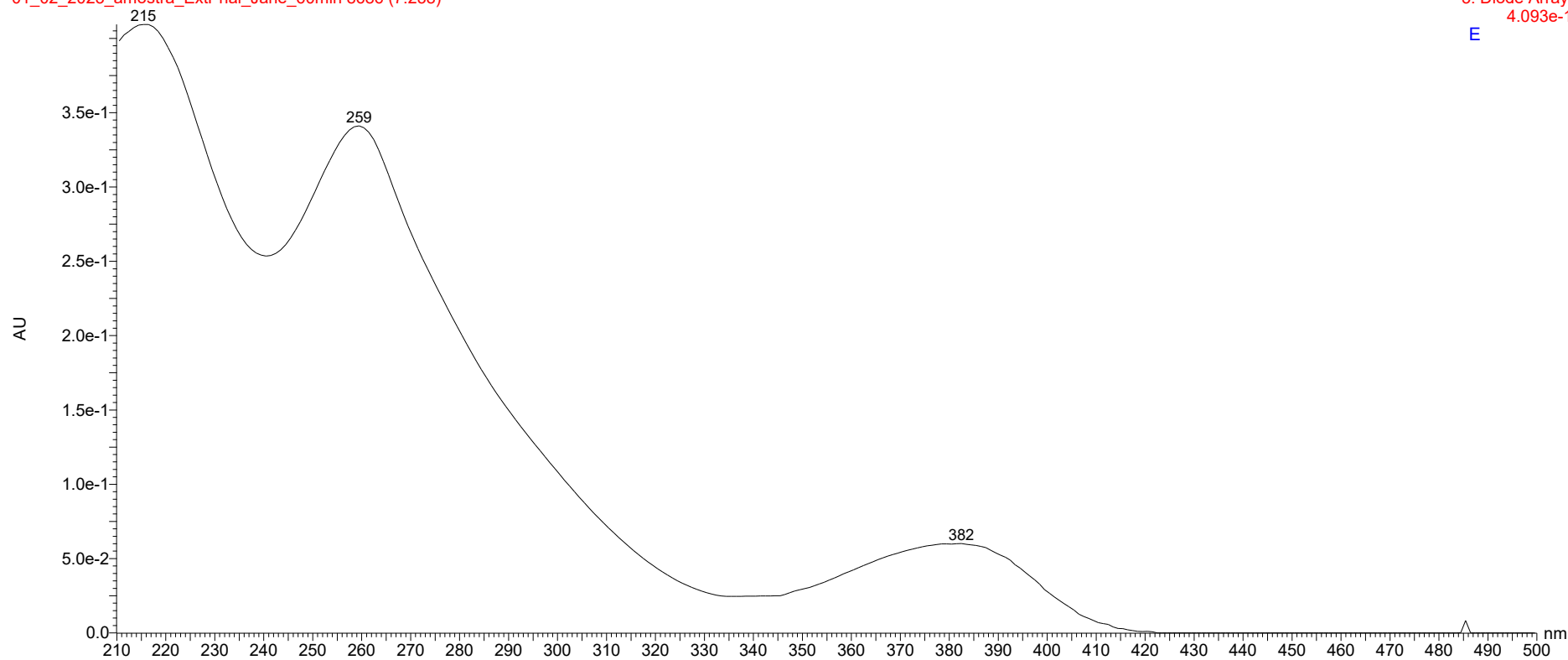


**Figura 81:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico D do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 259 e 382 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 8686 (7.238)

3: Diode Array  
4.093e-1  
E



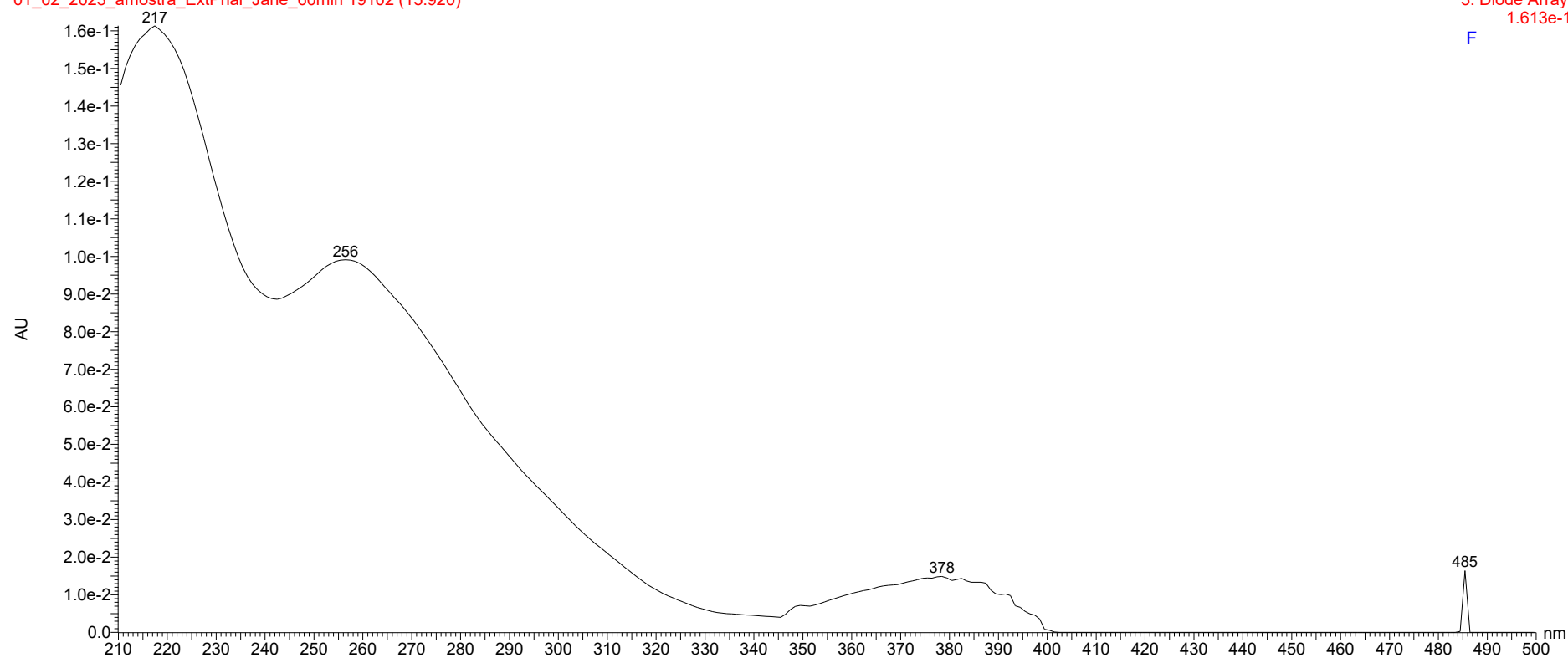
**Figura 82:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico E do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 259 e 382 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 19102 (15.920)

3: Diode Array  
1.613e-1

F

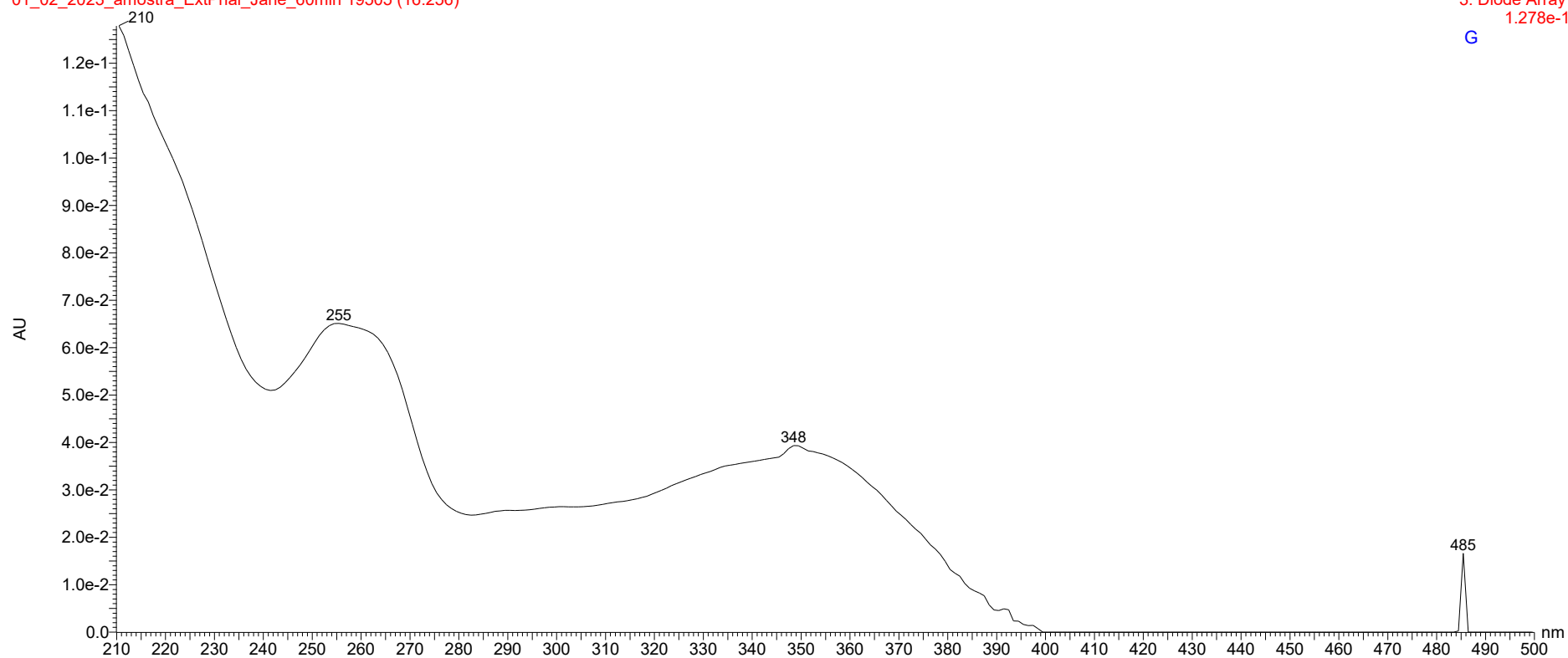


**Figura 83:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico F do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 256 e 378 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 19505 (16.256)

3: Diode Array  
1.278e-1  
G



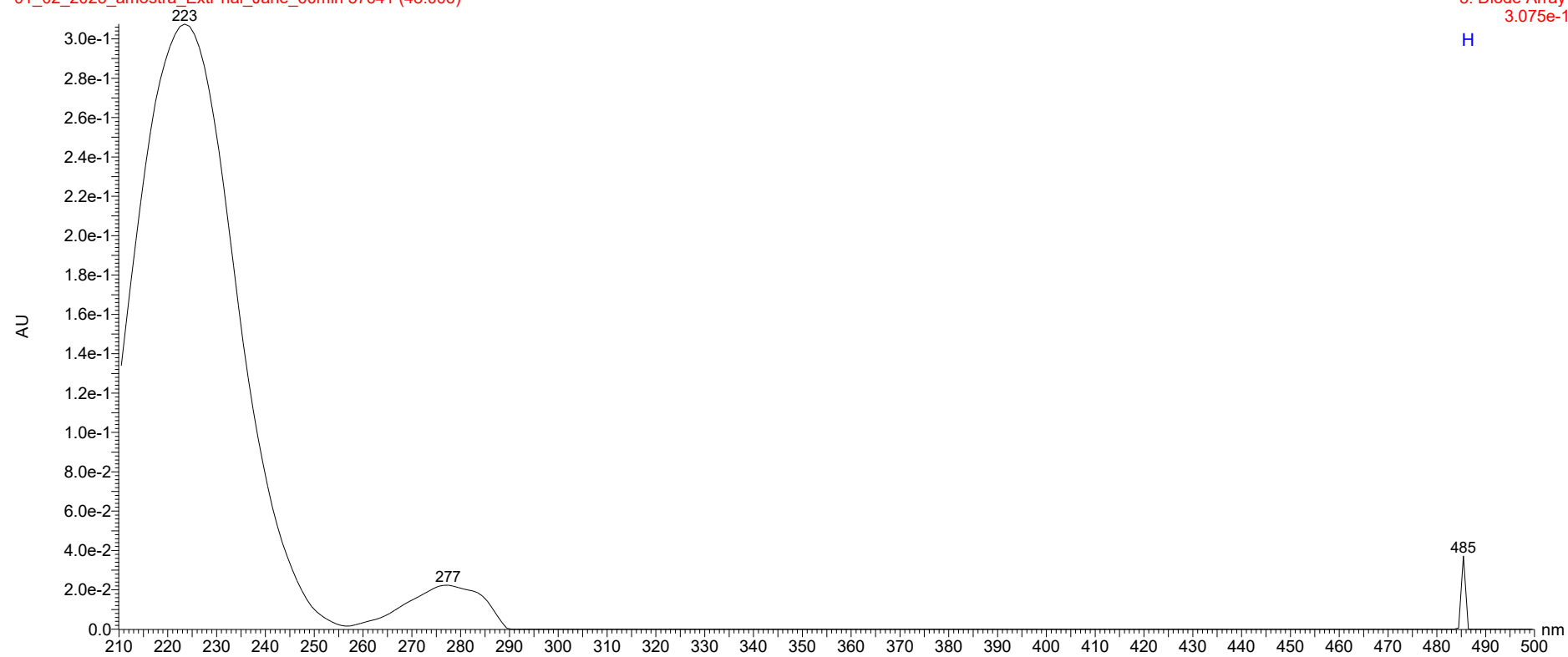
**Figura 84:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico G do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 255 e 348 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 57641 (48.006)

3: Diode Array  
3.075e-1

H

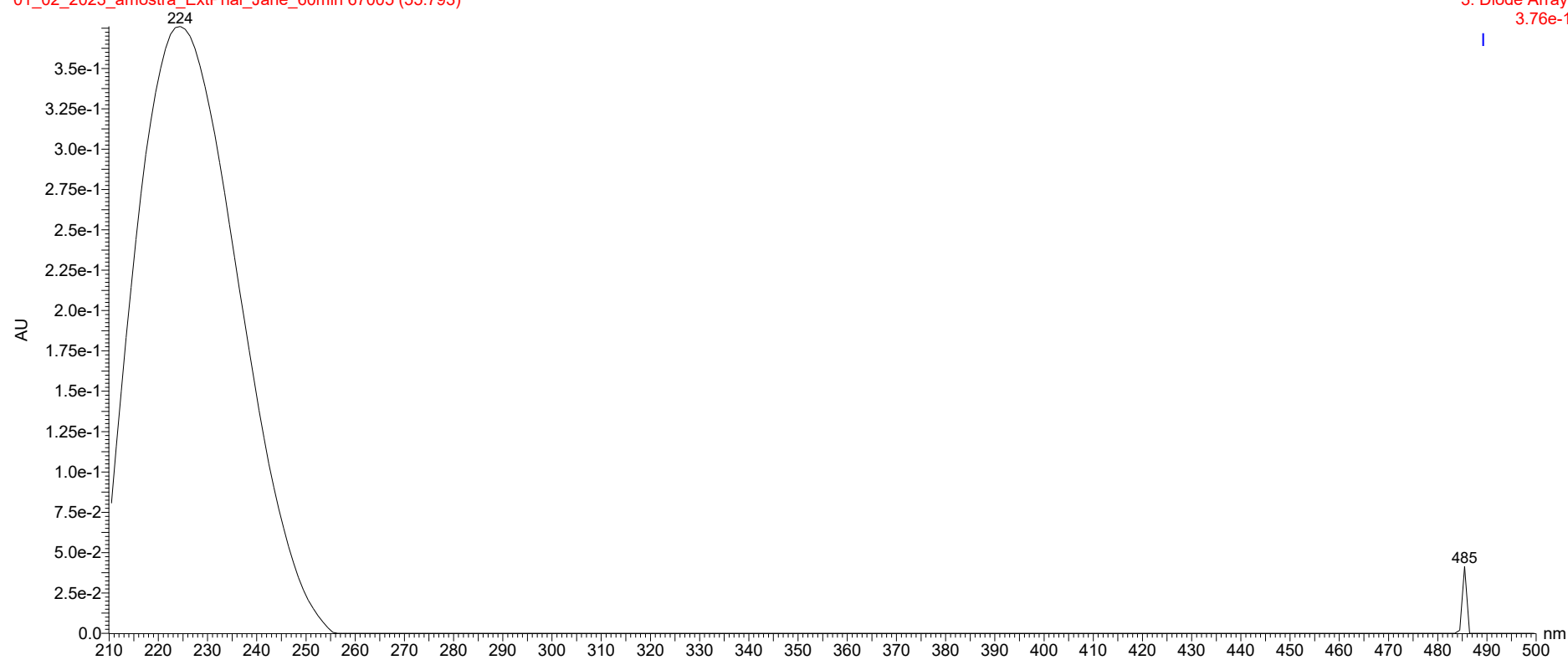


**Figura 85:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico H do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 223 e 277 nm.

coluna codigo C10\_condicao tese JH

01\_02\_2023\_amostra\_ExtPhal\_Jane\_60min 67005 (55.793)

3: Diode Array  
3.76e-1



**Figura 86:** Espectros obtidos por UHPLC-PDA-ESI-MS/MS para o pico I do extrato etanólico de *T. phaeocarpa* adquiridos no (a) UV, com máximos de absorção em 224 nm.

