

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ROSÂNGELA SANTOS PEREIRA

**ATIVIDADE DE ESPÉCIES VEGETAIS RICAS EM TRITERPENOS E POLIFENÓIS
SOBRE O *Zika virus* E INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Terminalia glabrescens* E
*Maytenus ilicifolia***

Belo Horizonte

2022

ROSÂNGELA SANTOS PEREIRA

**ATIVIDADE DE ESPÉCIES VEGETAIS RICAS EM TRITERPENOS E POLIFENÓIS
SOBRE O *Zika virus* E INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE *Terminalia glabrescens* E
*Maytenus ilicifolia***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:

Prof. Dr. Fernão Castro Braga, FAFAR, UFMG

Coorientadoras:

Prof^a. Dra. Danielle da Glória de Souza, ICB, UFMG

Prof^a. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana, FAFAR, UFMG

Colaboradores:

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

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, ICB, UFMG

Prof^a. Dra. Vivian Vasconcelos Costa, ICB, UFMG

Belo Horizonte

2022

P436a Pereira Rosângela Santos.
Atividade de espécies vegetais ricas em triterpenos e polifenóis sobre o *zika virus* e investigação fitoquímica de *Terminalia glabrescens* e *Maytenus ilicifolia* [recurso eletrônico] / Rosângela Santos Pereira. – 2022.
1 recurso eletrônico (248 f. : il.) : pdf.

Orientador: Fernão Castro Braga.
Coorientadoras: Danielle da Glória de Souza e Priscilla Rodrigues Valadares Campana.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader

1. Zika virus – Teses. 2. Compostos fitoquímicos – Teses. 3. Extratos vegetais – Teses. 4. Matéria médica vegetal – Teses. I. Braga, Fernão Castro. II. Souza, Danielle da Glória de. III. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD:615.321



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ATIVIDADE DE ESPÉCIES VEGETAIS RICAS EM TRITERPENOS E POLIFENÓIS SOBRE O Zika virus E INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DE Terminalia glabrescens E Maytenus ilicifolia"

ROSÂNGELA SANTOS PEREIRA

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. Izabella Thaís da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou

Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Renato Santana de Aguiar
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

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

Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 20 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fernão Castro Braga, Professor do Magistério Superior**, em 20/06/2022, às 18:59, 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 **Lucienir Pains Duarte, Professora do Magistério**

assinatura
eletrônica

art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

sei!
assinatura
eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 20/06/2022, às 21:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

sei!
assinatura
eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Izabella Thais da Silva, Usuário Externo**, em 20/06/2022, às 23:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

sei!
assinatura
eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 21/06/2022, às 12:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

sei!
assinatura
eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Simone Goncalves dos Santos, Professora do Magistério Superior**, em 22/06/2022, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

sei!
assinatura
eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 22/06/2022, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

sei!
assinatura
eletrônica

Documento assinado eletronicamente por **Tânia Maria de Almeida Alves, Usuário Externo**, em 22/06/2022, às 12:41, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[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 1490820 e o código CRC 4EE99715.

Dedico este trabalho:

À Deus todo poderoso por ser meu refúgio e alívio em todos os momentos.

À minha família pelo amor e companheirismo, mesmo a 1247 Km.

Aos verdadeiros amigos pelo apoio e incentivo de sempre.

*Ao meu orientador e aos colaboradores pela oportunidade e por acreditar em meu trabalho
sem conhecer.*

*E a todos que contribuíram de alguma forma (seja com palavras, atitudes, ações e abraços)
nessa caminhada que sempre foi um sonho de vida.*

Quando as palavras são proferidas com fé, todos sonhos e objetivos se encaminham de acontecer. Então, ouse sonhar, sonhar com ações e coragem, se desanimar continue “a nadar” e para reanimar se aproxime de gente leve como a brisa do mar.

By Rosângela Pereira

AGRADECIMENTOS

À Deus pela fé, força, ânimo, alívio, equilíbrio e por ser meu porto seguro em todos os meus dias. Eternamente grata a Deus por me ajudar chegar até aqui, e ao longo do caminho tenho sentindo seu cuidado e como o Senhor tem tocado o coração das pessoas para me ajudar, “Oh Glória”. Com o coração cheio de alegria posso dizer: - Deus em minha vida fez nova todas as coisas, e ele mesmo tem sonhado junto comigo, os meus sonhos, as minhas conquistas e tem aberto portas que eu nem imaginava. Resumo essa trajetória em uma frase, como diz o Salmo 117: - Dai graças ao Senhor, porque Ele é bom pois eterna é a sua misericórdia.

À minha família, especialmente minha mãe e meus irmãos pelo amor, incentivo, apoio e por acreditarem junto comigo nos meus sonhos e vibrarem com as minhas conquistas. A Mãe e Rosane pelas ligações nossas de cada dia que me fazia sentir que eu nunca estava sozinha e que também por eles eu estava aqui. A meu sobrinho Davi por ser a alegria dos meus dias.

Aos meus bons e velhos amigos de Jequié, cada um sabe da sua importância para mim “sem citar nomes”, somente gratidão pela amizade e dizer o quanto são especiais para mim. Mesmo, em meio à distância nunca deixaram de me incentivar e dizer uma palavra de carinho e conforto, um aconchego para o meu coração.

À Franciele e Camilla pela amizade e apoio. Fran, uma baiana mais arretada que eu rsrs, me ajudou no momento que eu mais precisei e me levou onde somente em Deus podia me curar e renovar minha fé. Somente ali eu conheci algo que eu jamais tinha visto e sentido, e aprendi o quão amoroso e misericordioso é o Senhor. Camilla, uma mineira cheia de fé e meiga, que se dispôs a rezar comigo (e quantos milagres e sinais aconteceram) e me ajudar nesse processo em que eu sabia que sozinha não conseguiria e creio que por isso Deus me apresentou você e a comunidade *Mater Crucis*. Ali vocês me acolheram, me embalaram nos braços de Jesus e Maria e minha alma retornou a paz.

Ao “anjo que caiu do céu e foi me apresentado em BH” de nome incomum rsrs, Bibó agradeço por toda ajuda, conhecimento, dicas, “transição de pensamento”, ensinamentos de vida, conselhos e alguns puxões de orelha também rsrs. As várias mensagens de incentivo fizeram toda a diferença nessa caminhada. Especialmente, aquelas palavrinhas mágicas “Forças, forças, forças, (n + 1) forças para você” sempre me alegrava e me fazia continuar com mais força, porque toda vez você me fazia lembrar porque eu estava aqui. Como seu apelido diz você é uma pessoa fora do comum, no sentido, que quem te conhece sabe o coração enorme e acolhedor que você tem. Admiro seu jeito de ser e de viver a vida. Gracias por me ensinar que em toda e qualquer situação sempre há um lado bom, e saiba que cada palavra está guardada aqui comigo.

Ao Douglas, meu companheiro, pelo amor, amizade e parceria, que desde final de 2019 vem caminhando junto comigo e com ele a vida se torna mais leve.

Ao William pela amizade, conhecimentos compartilhados e por ouvir minhas angústias, estresses e preocupações. Um mineiro de interior que tem um coração enorme e se dispôs só e somente só para me ajudar a dá um UP no meu currículo.

À Tarciana pela amizade mais que sincera e acolhedora, e por agarrar as minhas lutas como se fosse suas em prol de me ajudar. Essa baiana grossa, mas que é um amorzinho rsrs, opa eu não podia esquecer das longas conversas (mais de 1 hora no telefone), é quase uma psicóloga disfarçada de farmacêutica rsrs.

À Angela pela amizade, carinho, oportunidade e momentos de distração à base de café e um dedo de prosa, debaixo de uma árvore com ventinho.

À Patrícia Candida pela amizade, carinho, conselhos e cuidado. Essa é uma mãezona, obrigada por me acolher e me tratar tão bem.

Às Profs. Dr^a. Lucienir Duarte Pains e Dr^a. Grasiely F. de Sousa e a técnica Mirra pelas análises de CG-EM. Professoras obrigada pela amizade, apoio e pelos convites de festinhas do NEPLAM. Também agradeço a Mariana por toda disposição e ajuda.

Ao Professor Dr. Ricardo José Alves gratidão pela sua generosidade em me indicar ao professor Fernão para seleção de doutorado e também pela cordialidade e empatia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernão Castro Braga, meu sincero agradecimento pela oportunidade e por acreditar em meu trabalho sem conhecer. Obrigada por todo aprendizado, incentivo, cobranças (e olha que não foram poucas... até sonhar com um caminhão carregado de placas rsrs) e por me ajudar a lapidar alguns pontos que são essenciais para ser um bom profissional.

Ao Professor Dr. Mauro Martins Teixeira pelas oportunidades de conceder a bolsa de doutorado por um ano e pelo projeto de pesquisa clínica. Obrigada por acreditar na palavra do professor Fernão e o professor Fernão acreditar em mim. Estou com coração feliz e radiante porque com essas oportunidades, essa etapa especialmente e outras coisas importantes na minha vida se concretizaram.

As Prof. Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa e Prof. Dr^a. Danielle da Glória de Souza por todo aprendizado, confiança e disposição em colaborar com meu projeto de pesquisa. Vivian obrigada pelo incentivo, atenção e também pela oportunidade em participar do projeto Dompé.

Aos Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua e Prof. Dr^a Priscilla Valadares Campana pelos conhecimentos e por não hesitar em tirar minhas dúvidas até de noite e final de semana. Esses dois até bancada ia comigo, esse dia era de muito aprendizado e diversão. Priscilla é aquela que

quando conversava transmitia que tudo estava bom e bem e Rodrigo aquele que sempre traz um momento de descontração.

À todos os colegas do Laboratório de Fitoquímica pelos conhecimentos compartilhados, especialmente a Wellerson e Janikelly que sempre estavam disposto a dar uma mãozona quando eu precisava, em nível escala de produção. Wellerson obrigada por sempre estar disposto a me ajudar. Janikelly e Patrícia obrigada pelas resenhas e momentos de distração à base de caldo de cana e pastel (melhor parte, comer rsrs). Jane valeu pelas ligações algumas eram desabafos e outras apenas de companhia rs.

Aos técnicos do laboratório de Fitoquímica, Raquel e André, obrigada pela disposição e apoio técnico.

As técnicas do laboratório de Imunofarmacologia, Ilma, Rose e ex-técnica Ingredy, obrigada pela atenção, carinho e por estarem sempre dispostas a ajudar no que eu precisasse no laboratório.

Aos meus ICs Gabriel, Françoise e Izabel pela contribuição na realização dos experimentos. Especialmente, Gabriel por não hesitar em me acompanhar nos finais de semana e feriados e Fran por não hesitar em chegar 05:30 da manhã no laboratório. Françoise, além de ser a melhor IC, se tornou uma pessoa muito especial, me acolheu com um carinho e sensibilidade incrível capaz de me entender e por vezes sofrer junto comigo em certas situações.

Ao professor Dr. Djalma Menezes de Oliveira obrigada pela amizade e por ceder os extratos de *Maytenus* para estudo.

Aos professores Dr. Geraldo Wilson Fernandes e Gustavo Heiden obrigada realizar a coleta das espécies e identificação das espécies de *Baccharis*.

Ao Prof. Dr. José Dias de Souza Filho agradeço pela disposição e colaboração na realização dos experimentos de RMN.

A todas as pessoas que compartilharam comigo esta trajetória e aquelas que simplesmente passaram e me ajudaram seja com palavras, atitudes, ações e abraços, minha gratidão.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFMG pelo conhecimento transmitido e pelo comprometimento com o ensino.

À UFMG pela estrutura fornecida durante todo esse período de doutorado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus emergente, cuja infecção em humanos pode levar a complicações graves como síndrome de Guillain-Barré e microcefalia congênita. Não existem vacinas ou fármacos para tratar as infecções por ZIKV, justificando-se a busca por antivirais efetivos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar produtos naturais com potencial atividade frente ao ZIKV a partir da triagem de extratos vegetais e estudo fitoquímico de extratos ativos. As espécies vegetais foram selecionadas por critério quimiosistemático, priorizando-se aquelas ricas em polifenóis, triterpenos e esteroides, classes de produtos naturais relatados com atividade anti-ZIKV ou antiviral de amplo espectro. Trinta e sete extratos vegetais, oito compostos selecionados e uma mistura de friedelina-friedelinol foram inicialmente triados em células Vero CCL-81 infectadas com ZIKV em concentrações não citotóxicas (3, 10 e 30 µg/mL para extratos e mistura; 1, 3 e 10 µM para compostos selecionados e 3 e 10 µM para substâncias isoladas). Cerca de 35% dos extratos reduziram a carga viral de forma concentração dependente, a saber, *Maytenus ilicifolia* (extratos diclorometânico e metanólico), *M. rigida*, *M. truncata*, *M. acanthophylla*, *Ouratea spectabilis*, *Baccharis calvescens*, *B. imbricata*, *B. magnifica*, *B. opuntioides*, *Terminalia glabrescens*, *T. phaeocarpa* e *Echinodorus grandiflorus*. Por outro lado, nenhuma das substâncias avaliadas reduziram a carga viral do ZIKV. Na sequência, a atividade anti-ZIKV dos extratos ativos foi avaliada em concentrações não citotóxicas em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, observando-se significativa atividade antiviral (variando de 1,7 a 4,5 log de inibição da carga viral) para *E. grandiflorus*, *M. ilicifolia* (extrato diclorometânico), *M. rigida*, *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens*. A concentração citotóxica mediana (CC₅₀, µg/mL) de 8 extratos ativos [*M. rigida*, *M. truncata*, *E. grandiflorus*, *M. ilicifolia* (diclorometânico e metanólico), *B. calvescens*, *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa*] foi determinada em células Vero CCL-81 e SH-SY5Y, sendo significativamente maiores na primeira linhagem. Foi realizada a investigação preliminar do mecanismo de ação dos oito extratos ativos em células Vero CCL-81. Os extratos não apresentaram efeito profilático e não atuaram na etapa de internalização da partícula viral, sugerindo outros mecanismos de ação antiviral. A concentração efetiva mediana (CE₅₀, µg/mL) foi determinada em células SH-SY5Y para os extratos de *M. ilicifolia* (EC₅₀ = 16,8 ± 10,3), *T. phaeocarpa* (EC₅₀ = 22,0 ± 6,8) e *T. glabrescens* (EC₅₀ = 20,4 ± 10,2), sendo obtidos índices de seletividade de 3,4; 4,8 e 6,4; respectivamente. Procedeu-se à desreplificação dos extratos ativos de *M. ilicifolia* (extrato diclorometânico) e de *T. glabrescens* (extrato etanólico) por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, resultando na identificação de seis triterpenos (ácidos ursólico e betulínico, friedelina, friedelinol, lupeol e amirina) no primeiro e 27 compostos fenólicos no segundo. Ambos os extratos foram fracionados por cromatografia em coluna de sílica gel. As frações hexânica e diclorometânica obtidas foram analisadas por CG-EM, que revelou perfis semelhantes e permitiu identificar 11 constituintes, sendo sete ésteres, um álcool, um triterpeno e dois hidrocarbonetos. O estudo fitoquímico de *T. glabrescens* resultou na obtenção de três sólidos, cuja análise por métodos espectrométricos usuais (EM e RMN 1D e 2D) indicou tratar-se de glutinol, mistura de α- e β-amirina e β-sitosterol, sendo os dois primeiros inéditos na espécie. Já o estudo fitoquímico do extrato de *M. ilicifolia* possibilitou isolar e identificar o friedelan-3β-ol. As frações em diclorometano e acetato de etila de ambas as espécies apresentaram significativa atividade anti-ZIKV em células Vero CCL-81 e SH-SY5Y. Por sua vez, β-sitosterol isolado de *T. glabrescens*

(CC₅₀ = >300 µM, CE₅₀ = 71,27±7,08 µM, IS = 4,20) e friedelan-3β-ol isolado de *M. ilicifolia* (CC₅₀ = >300 µM, CE₅₀ = 58,23±19,85 µM e IS = 5,15) reduziram significativamente a carga viral em células SH-SY5Y infectadas com ZIKV. Os resultados obtidos evidenciam o potencial promissor dos extratos de *M. ilicifolia* e *T. glabrescens* como fontes de produtos naturais ativos contra o ZIKV, especialmente triterpenos e esteróis.

Palavras-chave: Quimiosistemática; atividade anti-ZIKV; células Vero CLL-81; células SH-SY5Y; *Maytenus ilicifolia*; *Terminalia glabrescens*.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an emerging arbovirus, whose infection in humans can lead to serious complications such as Guillain-Barré syndrome and congenital microcephaly. There are no vaccines or drugs to treat ZIKV infections, thus justifying the search for effective antivirals. In this context, the present work aimed to identify natural products with potential activity against ZIKV based on the screening of plant extracts and phytochemical study of some active extracts. Plant species were selected by a chemosystematic approach, prioritizing those rich in polyphenols, triterpenes, and steroids, classes of natural products reported to have anti-ZIKV or broad-spectrum antiviral activity. Thirty-seven plant extracts, eight selected compounds, and a mixture of friedelin-friedelinol were initially screened on ZIKV-infected Vero CCL-81 cells at non-cytotoxic concentrations (3, 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for the extracts and mixture; 3 and 10 μM for the compounds). About 35% of the extracts reduced viral load in a concentration dependent manner, namely, *Maytenus ilicifolia* (dichloromethane and methanol extracts), *M. rigida*, *M. truncata*, *M. acanthophylla*, *Ouratea spectabilis*, *Baccharis calvescens*, *B. imbricata*, *B. magnifica*, *B. opuntioides*, *Terminalia glabrescens*, *T. phaeocarpa* and *Echinodorus grandiflorus*. On the other hand, none of the assayed compounds inhibited ZIKV replication. Subsequently, the anti-ZIKV activity of the active extracts was evaluated at non-cytotoxic concentrations in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and significant antiviral activity (ranging from 1.7 to 4.5 log inhibition of viral load) was obtained for *E. grandiflorus*, *M. ilicifolia* (dichloromethane extract), *M. rigida*, *T. phaeocarpa* and *T. glabrescens*. The median cytotoxic concentration (CC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) of 8 active extracts [*M. rigida*, *M. truncata*, *E. grandiflorus*, *M. ilicifolia* (dichloromethane and methanol extracts), *B. calvescens*, *T. glabrescens* and *T. phaeocarpa*] was determined in Vero CCL-81 and SH-SY5Y cells, being significantly higher in the first viral strain. The preliminary investigation of the mechanism of action of the eight active extracts in Vero CCL-81 cells was carried out. The extracts did not present a prophylactic effect and did not act in the step of internalization of the viral particle, suggesting other mechanisms of antiviral action. The median effective concentration (EC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) was determined in SH-SY5Y cells for the extracts of *M. ilicifolia* ($\text{EC}_{50} = 16.8 \pm 10.3$), *T. phaeocarpa* ($\text{EC}_{50} = 22.0 \pm 6.8$) and *T. glabrescens* ($\text{EC}_{50} = 20.4 \pm 10.2$), being obtained selectivity indexes (SI) of 3.4, 4.8, and 6.4, respectively. The active extracts of *M. ilicifolia* (dichloromethane extract) and *T. glabrescens* (ethanol extract) were dereplicated by UPLC-DAD-ESI-MS/MS, resulting in the identification of six triterpenes (ursolic and betulinic acids, friedelin, friedelinol, lupeol and amyrin) in the first and 27 phenolic compounds in the second. Both extracts were fractionated by silica gel column chromatography. The obtained *n*-hexane and dichloromethane fractions were analyzed by GC-MS, which revealed similar chemical profiles and led to the identification of 11 compounds, comprising 7 esters, 1 alcohol, 1 triterpene and 2 hydrocarbons. The phytochemical study of *T. glabrescens* afforded three solids, whose analysis by conventional spectrometric methods (MS and 1D and 2D NMR) allowed their identification as glutinol, β -sitosterol, and a mixture of α - and β -amyrin, of which only the second has been reported for the species. The phytochemical study of *M. ilicifolia* extract resulted in the isolation and identification of friedelan-3 β -ol. The dichloromethane and ethyl acetate fractions of both species showed significant anti-ZIKV activity in Vero CCL-81 and SH-SY5Y cells. In its turn, β -sitosterol isolated from *T. glabrescens* ($\text{CC}_{50} = >300 \mu\text{M}$, $\text{CE}_{50} = 71.27 \pm 7.08 \mu\text{M}$, $\text{SI} = 4.20$) and friedelan-3 β -ol isolated from *M.*

ilicifolia ($CC_{50} = >300 \mu\text{M}$, $CE_{50} = 58.23 \pm 19.85 \mu\text{M}$ and $IS = 5.15$) significantly reduced the viral load in ZIKV-infected SH-SY5Y cells. The obtained results highlight the potential of *M. ilicifolia* and *T. glabrescens* extracts as sources of anti-ZIKV compounds, especially triterpenes and sterols.

Keywords: Chemosystematics; anti-ZIKV activity; Vero CLL-81 cells; SH-SY5Y cells; *Maytenus ilicifolia*; *Terminalia glabrescens*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas com infecções humanas pelo <i>Zika virus</i> , relatadas entre 2007 e 2016. Fonte: Petersen e colaboradores (2016).....	30
Figura 2. Infecção humana por <i>Zika virus</i> no Brasil. Fonte: Lowe e colaboradores (2018).	31
Figura 3. Genoma do <i>Zika virus</i> . Fonte: Rombi e colaboradores (2020).	34
Figura 4. Estrutura de criomicroscopia eletrônica do <i>Zika virus</i> . Adaptado de: Kostyuchenko e colaboradores (2016).	35
Figura 5. Ciclo de multiplicação do <i>Zika virus</i> . Adaptado de: Rombi e colaboradores (2020).	36
Figura 6. Infecção pelo <i>Zika virus</i> em mulheres grávidas. Fonte: Rombi e colaboradores (2020).	37
Figura 7. Ciclos de transmissão do <i>Zika virus</i> . Fonte: Kurscheidt e colaboradores (2019).	39
Figura 8. Entrada do <i>Zika virus</i> na célula hospedeira, replicação viral e interação com vias celulares. Fonte: Ojha e colaboradores (2018).	41
Figura 9. Tropismo do <i>Zika virus</i> para diferentes células e tecidos. Fonte: Miner e Diamond (2017).	43
Figura 10. Artigos relacionados à atividade de produtos naturais contra o <i>Zika virus</i> , publicados entre 1997 e maio de 2022. Fonte: própria.	54
Figura 11. Esquema do ensaio para determinação do título viral.....	65
Figura 12. Esquema do ensaio para avaliação da citotoxicidade e determinação da CC ₅₀	68
Figura 13. Esquema do ensaio para detecção de atividade antiviral.	70
Figura 14. Esquema do ensaio de titulação viral.	72
Figura 15. Esquema do ensaio de avaliação do efeito profilático.	73
Figura 16. Esquema do ensaio de avaliação da inibição da internalização viral.....	74
Figura 17. Citotoxicidade dos extratos em células Vero CCL-81, avaliados pelo método do MTT.....	92
Figura 18. Citotoxicidade dos extratos avaliados em células Vero CCL-81, avaliados pelo método do LDH.....	93
Figura 19. Citotoxicidade das substâncias avaliadas em células Vero CCL-81, utilizando os métodos do MTT (A) e do LDH (B).	95
Figura 20. Citotoxicidade de cinco extratos vegetais avaliados em células Vero CCL-81 pelo método da SRB.....	96
Figura 21. Padronização da MOI do ZIKV em células Vero CCL-81.....	98

Figura 22. Efeito de extratos e de mistura de triterpenos sobre a viabilidade celular pelos métodos do MTT e LDH e determinação da carga viral em células Vero CCL-81 infectadas por ZIKV.....	102
Figura 23. Efeito das substâncias testadas frente ao ZIKV avaliadas em células Vero CCL-81, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B) e determinação da carga viral (C).	109
Figura 24. Padronização da MOI do ZIKV em células SH-SY5Y, utilizando método do MTT (A), LDH (B) e determinação da carga viral (C).....	112
Figura 25. Citotoxicidade dos extratos selecionados em células SH-SY5Y, empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).	114
Figura 26. Efeito dos extratos selecionados frente ao ZIKV, ensaiados em células SH-SY5Y, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).	115
Figura 27. Carga viral obtida no ensaio de efeito profilático para os extratos selecionados frente ao ZIKV.....	119
Figura 28. Carga viral obtida no ensaio de internalização da partícula viral, para os extratos selecionados frente ao ZIKV.	120
Figura 29. Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS para o extrato etanólico (EE) de folhas de <i>T. glabrescens</i> no modo <i>scan</i> com detecção no UV (a) e nos modos ESI ⁻ (b) e ESI ⁺ (c) para análise do perfil exploratório. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.....	125
Figura 30. Espectro de MRM para a transição m/z 191 → 127 (a) e espectro de massas MS/MS para o íon em m/z 191 Da (b) obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS para o extrato etanólico (EE) das folhas de <i>T. glabrescens</i> adquiridos no modo de ionização negativo (ESI ⁻). Condições de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	125
Figura 31. Cromatograma obtido no experimento de <i>Daughter scan</i> (ESI ⁻) para o íon em m/z 191 Da por UPLC-DAD-ESI-MS/MS para o extrato etanólico (EE) de folhas de <i>T. glabrescens</i> . Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	126
Figura 32. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento <i>Daughter scan</i> (ESI ⁻) para o íon em m/z 191 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância destacada no extrato etanólico (EE) de folhas de <i>T. glabrescens</i> . Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	126
Figura 33. Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo <i>scan</i> com detecção no UV (a); ESI ⁻ (b) e ESI ⁺ (c) para o extrato etanólico (EE) de folhas de <i>M. ilicifolia</i> para análise do perfil exploratório. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	129

Figura 34. Espectro de massas obtido para a substância com TR = 44,02 min no cromatograma de TIC registrado para as amostras GF74 e GF94 de FrDCM A e GF52 de FrDCM B, identificado como acrilato de pentadecila.	131
Figura 35. Compostos identificados em <i>T. glabrescens</i> e <i>M. ilicifolia</i> por CG-EM.....	143
Figura 36. Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS para GF154 com detecção no DAD (A), TIC ESI ⁻ (B) e TIC ESI ⁺ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	144
Figura 37. Espectros no UV (A) e de massas obtido para GF154 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, no modo de ionização positivo ESI ⁺ (B) e negativo ESI ⁻ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	145
Figura 38. Espectro de RMN de ¹³ C obtido para GF154 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	147
Figura 39. Subespectro de DEPT-135 obtido para GF154 (CDCl ₃ , 150 MHz).	147
Figura 40. Expansão do mapa de contornos HMBC na região do sinal em δ 29,70 referente a impureza, observado no espectro obtido para GF154 (CDCl ₃ , 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C).	148
Figura 41. Expansão do mapa de contornos HMBC indicando manchas de correlação entre H-6 e os carbonos C-4, C-7, C-8 e C-10 e H-3 com C-1 para GF154 (CDCl ₃ , 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C).	148
Figura 42. Espectro de RMN de ¹ H de GF154 (CDCl ₃ , 600 MHz).	150
Figura 43. Expansão do mapa de contornos COSY obtido para GF154 (CDCl ₃ , 600 MHz).	152
Figura 44. Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para GF154 (CDCl ₃ , 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C).	153
Figura 45. Proposta de fragmentação da molécula do glutinol (GF154). Vide espectro de massas na Figura 37.....	155
Figura 46. Cromatogramas obtidos para GF195 por UPLC-DAD-ESI-MS, com detecção no DAD (A), TIC ESI ⁻ (B) e TIC ESI ⁺ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	156
Figura 47. Espectro no UV (A) e de massas obtido para GF195 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, no modo de ionização positivo negativo ESI ⁻ (B). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	157
Figura 48. Espectro de RMN de ¹³ C obtido para GF195 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	159
Figura 49. Expansões do espectro de RMN de ¹³ C obtido para GF195 (CDCl ₃ , 150 MHz). Legenda: (a) = α-amirina e (b) = β-amirina.....	159

Figura 50. Subespectro DEPT-135 obtido para GF195 (CDCl ₃ , 150 MHz). Legenda: (a) = α -amirina e (b) = β -amirina.....	160
Figura 51. Espectro de RMN de ¹ H obtido para GF195 (CDCl ₃ , 600 MHz). Legenda: (a) = α -amirina e (b) = β -amirina.....	162
Figura 52. Proposta de fragmentação das moléculas de α - e β -amirina (GF195).	164
Figura 53. Cromatogramas obtidos para GF231 por UPLC-DAD-ESI-MS, com detecção no DAD (A), TIC ESI ⁻ (B) e TIC ESI ⁺ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	165
Figura 54. Espectro no UV (A) e de massas obtido para GF231 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, no modo de ionização positivo ESI ⁺ (B). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.	166
Figura 55. Espectro de RMN de ¹³ C obtido para GF231 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	167
Figura 56. Subespectro DEPT-135 obtido para GF231 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	168
Figura 57. Espectro de RMN de ¹ H obtido para GF231 e expansões (CDCl ₃ , 600 MHz).....	170
Figura 58. Proposta de fragmentação da molécula de β -sitosterol.	172
Figura 59. Espectro de RMN de ¹³ C obtido para SOL1 (CDCl ₃ , 150 MHz).	173
Figura 60. Subespectro de DEPT-135 obtido para SOL1 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	174
Figura 61. Espectro de RMN de ¹ H obtido para SOL1 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	176
Figura 62. Viabilidade celular das frações de <i>T. phaeocarpa</i> e <i>T. glabrescens</i> em células Vero CCL-81 empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).	178
Figura 63. Viabilidade celular das frações de <i>T. phaeocarpa</i> e <i>T. glabrescens</i> em células SH-SY5Y, empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).	179
Figura 64. Efeito das frações de <i>T. phaeocarpa</i> e <i>T. glabrescens</i> frente ao ZIKV, ensaiados em células Vero CCL-81, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).	181
Figura 65. Efeito das frações de <i>T. phaeocarpa</i> e <i>T. glabrescens</i> frente ao ZIKV, ensaiados em células SH-SY5Y, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).....	182
Figura 66. Viabilidade celular das substâncias isoladas de <i>T. phaeocarpa</i> e <i>T. glabrescens</i> em células SH-SY5Y, empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).	183
Figura 67. Efeito dos compostos isolados de <i>T. phaeocarpa</i> e <i>M. ilicifolia</i> frente ao ZIKV, ensaiados em células SH-SY5Y, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).	184

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies vegetais selecionadas para estudo.....	59
Tabela 2. Produtos naturais selecionados para estudo.....	62
Tabela 3. Rendimento extrativo da percolação de folhas de <i>Terminalia glabrescens</i> e <i>Maytenus ilicifolia</i>	75
Tabela 4. Rendimento das frações obtidas por filtração em coluna de sílica gel <i>flash</i> do extrato de folhas de <i>T. glabrescens</i>	76
Tabela 5. Frações obtidas do refractionamento de FrDCM A por cromatografia em coluna de sílica gel <i>flash</i>	77
Tabela 6. Agrupamento das frações resultantes do refractionamento de FrDCM A.....	78
Tabela 7. Frações obtidas da cromatografia em coluna de FrDCM B.....	79
Tabela 8. Agrupamento das frações resultantes do refractionamento de FrDCM B.	80
Tabela 9. Frações obtidas do fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de <i>M. ilicifolia</i> por cromatografia em coluna de sílica gel <i>flash</i>	81
Tabela 10. Agrupamento das frações resultantes do fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de <i>M. ilicifolia</i>	81
Tabela 11. Principais constituintes químicos relatados na literatura para as espécies selecionadas para estudo ou para outras espécies do gênero.	87
Tabela 12. Valores de citotoxicidade para 50% das células (CC ₅₀), determinados para os extratos selecionados, em linhagens de células Vero CCL-81 e SH-SY5Y.	117
Tabela 13. Substâncias identificadas putativamente por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no extrato etanólico (EE), nas frações em acetato de etila (FrEtOAc) e metanólica (FrMeOH) de <i>T. glabrescens</i>	127
Tabela 14. Compostos identificados putativamente no extrato diclorometânico de folhas de <i>M. ilicifolia</i> por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo e monitoramento de reações múltiplas (MRM) usando transições de íons específicas.	130
Tabela 15. Composição química dos grupos de frações reunidas GF74, GF85, GF94 de <i>T. glabrescens</i> , identificada por CG-EM.	132
Tabela 16. Composição química dos grupos de frações reunidas GF9, GF39, GF52, GF56 de <i>T. glabrescens</i> , identificada por CG-EM.	135
Tabela 17. Composição química dos grupos de frações reunidas GF10, GF33, GF40 de <i>M. ilicifolia</i> , identificada por CG-EM.....	139

Tabela 18. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C atribuídos para GF154 (CDCl_3 , 150 MHz) e comparação com dados da literatura relatados para o glutinol (CDCl_3 , 75 MHz).....	149
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e do mapa de contornos HSQC obtidos para GF154 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C) e comparação com dados da literatura para o glutinol (CDCl_3 , 300 MHz).	151
Tabela 20. Correlações heteronucleares observadas do mapa de contornos HMBC obtido para GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).	153
Tabela 21. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de GF195 (CDCl_3 , 150 MHz) e comparação com dados da literatura para α - e β -amirina (CDCl_3 , 50 MHz).	160
Tabela 22. Dados de RMN de ^1H obtidos para GF195 (CDCl_3 , 600 MHz) e dados da literatura relatados para α - e β -amirina (CDCl_3 , a 500 MHz e b 600 MHz).	163
Tabela 23. Comparação entre valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C obtidos para GF231 (CDCl_3 , 150 MHz) com dados da literatura relatados para o β -sitosterol (CDCl_3 , a 100 MHz e b 90,56 MHz).	168
Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) comparados com dados da literatura (CDCl_3 , 300 MHz).....	170
Tabela 25. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C obtidos para SOL1 (CDCl_3 , 150 MHz) e comparação com dados da literatura relatados para o friedelan-3 β -ol (CDCl_3 , a 50 MHz e b 75 MHz).....	174
Tabela 26. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H obtidos para SOL1 (CDCl_3 , 600 MHz) e comparação com dados da literatura relatados para o friedelan-3 β -ol (CDCl_3 , a 500 MHz e b 300 MHz).....	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EtOAc	Acetato de etila
RNA	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio
CMC	Carboximetilcelulose
SH-SY5Y	Células de neuroblastoma humano
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células tratadas
CE ₅₀	Concentração efetiva para 50% das células tratadas
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG	Cromatografia gasosa
DENV	<i>Dengue virus</i>
DP	Desvio padrão
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.i.	Diâmetro
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
NAD	Dinucleótido de nicotinamida
DEPT-135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135</i>
ECT	Embrapa Clima Temperado, Pelotas
EM	Espectro de massas
MS	Espectrômetro de massas
RF	Fator de retenção
Fr	Fração
g	Grama
Hz	Hertz
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HEX	Hexano

IS	Índice de Seletividade
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ESI	Ionização por electrospray
LDH	Lactato desidrogenase
m/m	Massa / massa
MM	Massa molecular
m/v	Massa/volume
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
DMEM	Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco
MEOH	Metanol
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidade de infecção
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
P.A.	Para análise
PTFE	Politetrafluoretileno
PF	Ponto de fusão
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPM	Rotações por minuto
SCZ	Síndrome congênita associada à infecção pelo <i>Zika virus</i>
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
PBS	Solução de tampão fosfato
SFB	Soro fetal bovino
TR	Tempo de retenção
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultravioleta
UFP	Unidade formadora de placas

UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
JEV	Vírus da encefalite japonesa
TBEV	Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
WNV	<i>West Nilo virus</i> (vírus do Oeste do Nilo)
YFV	<i>Yellow fever virus</i> (vírus da Febre Amarela)
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 História e epidemiologia do ZIKV	29
3.2 A família <i>Flaviviridae</i> e o gênero <i>Flavivirus</i>	32
3.3 O genoma do ZIKV e ciclo de multiplicação viral	33
3.4 Aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV	37
3.5 Transmissão e patogênese	38
3.6 Diagnóstico e profilaxia	44
3.7 Terapêutica atual e desenvolvimento de agentes anti-ZIKV	45
3.8 Espécies vegetais e produtos naturais ativos contra o ZIKV	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Solventes e reagentes	55
4.2 Materiais diversos	56
4.3 Equipamentos	57
4.4 Eluentes para CCD	58
4.5 Revelador para CCD	58
4.6 Cromatografia em camada delgada (CCD)	58
4.7 Ponto de fusão (PF)	59
4.8 Seleção de espécies para estudo	59
4.9 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos	61
4.10 Ensaio biológico	63
4.10.1 Linhagens celulares e vírus	63
4.10.2 Cultivo celular	64
4.10.3 Determinação do título viral	64
4.10.4 Preparo das soluções das amostras para ensaio	65
4.10.5 Ensaio para avaliação da citotoxicidade e determinação da CC ₅₀	66
4.10.6 Ensaio antivirais	69
4.10.6.1 Padronização da MOI	69

4.10.6.2	Ensaio para detecção da atividade antiviral, determinação da CE ₅₀ e IS	69
4.10.6.3	Titulação viral.....	71
4.10.7	Avaliação preliminar do mecanismo de ação.....	72
4.10.7.1	Avaliação do efeito profilático	72
4.10.7.2	Avaliação da inibição da internalização viral.....	73
4.10.8	Análise estatística.....	74
4.11	Estudo fitoquímico dos extratos selecionados	74
4.11.1	Obtenção dos extratos	74
4.11.2	Fracionamento preliminar de <i>T. glabrescens</i> por partição líquido/líquido.....	75
4.11.3	Fracionamento preliminar de <i>T. glabrescens</i> por filtração em coluna de sílica gel. 76	
4.11.3.1	Refracionamento de FrDCM A e FrDCM B	77
4.11.3.1.1	Refracionamento de FrDCM A	77
4.11.3.1.2	Refracionamento de FrDCM B	79
4.11.4	Fracionamento do extrato diclorometânico de <i>M. ilicifolia</i>	80
4.11.5	Análise de extratos e frações por UPLC-DAD-ESI-MS/MS	82
4.11.6	Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) 84	
4.11.7	Análises dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1	Seleção das espécies para estudo	86
5.2	Avaliação da citotoxicidade dos extratos em células Vero CCL-81	90
5.3	Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i>	97
5.3.1	Padronização das condições experimentais do ensaio para detecção de atividade antiviral.....	97
5.3.2	Atividade dos extratos e substâncias frente ao ZIKV em células Vero CCL-81	99
5.3.3	Padronização das condições experimentais do ensaio de atividade antiviral em células SH-SY5Y	111
5.3.4	Citotoxicidade dos extratos selecionados em células SH-SY5Y	113
5.3.5	Atividade dos extratos selecionados frente à infecção pelo ZIKV em células humanas SH-SY5Y	114
5.3.6	Valores de CC ₅₀ , CE ₅₀ e IS para os extratos selecionados	117
5.3.7	Avaliação preliminar do mecanismo de ação antiviral dos extratos selecionados...	118
5.4	Estudo fitoquímico dos extratos selecionados	122
5.4.1	Caracterização química dos extratos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS	122
5.4.1.1	Extrato etanólico e frações de folhas de <i>T. glabrescens</i>	122
5.4.1.2	Extrato diclorometânico de folhas de <i>M. ilicifolia</i>	129

5.4.2 Identificação estrutural de constituintes de <i>T. glabrescens</i> e <i>M. ilicifolia</i> por CG-EM.....	130
5.4.3 Identificação estrutural dos sólidos isolados de <i>T. glabrescens</i>	143
5.4.3.1 GF154.....	144
5.4.3.2 GF195.....	156
5.4.3.3 GF231.....	165
5.4.4 Identificação do sólido isolado de <i>M. ilicifolia</i>	172
5.5 Avaliação da atividade anti-ZIKV de frações e substâncias isoladas	177
5.5.1 Avaliação da viabilidade celular	177
5.5.2 Atividade anti-ZIKV das frações de <i>T. glabrescens</i> e <i>T. phaeocarpa</i>	179
5.5.3 Viabilidade celular e atividade anti-ZIKV dos compostos isolados em células SH-SY5Y.....	183
6 CONCLUSÃO.....	186
REFERÊNCIAS	187
APÊNDICE A – ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO	208
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS	235
APÊNDICE C – ESPECTROS DE MASSAS.....	245
APÊNDICE D – ESPECTROS DE RMN 2D.....	249

1 INTRODUÇÃO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus emergente, pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Sua principal via de transmissão é pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (FERRARIS et al., 2019). Além da transmissão horizontal, outras rotas foram relatadas, há exemplo da transmissão vertical durante a gravidez, sexual e por transfusão sanguínea (KURSCHEIDT et al., 2019). O ZIKV emergiu como uma ameaça global à saúde pública devido sua associação com problemas graves em humanos, incluindo microcefalia e síndrome congênita do Zika (SCZ), síndrome de Guillain-Barré e outras complicações neurológicas (CAO-LORMEAU et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2016). A replicação do ZIKV e a indução de morte neuronal são consideradas fatores-chave para a doença grave induzida pelo vírus (COSTA et al., 2017; OLMO et al., 2017).

Durante o surto de ZIKV, iniciado em 2015, o Brasil foi o país mais afetado, com estimativa de cerca de 440.000 a 1,3 milhões de casos relatados (LI et al., 2019). O vírus ainda circula no país, com elevado potencial de propagação. Modelos preditivos sugerem que a distribuição geográfica do vetor *A. aegypti* continuará a se expandir como consequência do crescimento e movimento populacional, urbanização e mudanças climáticas (MUSSO et al., 2019). Apesar dos impactos adversos na saúde humana, ainda não há vacina ou fármaco disponível para tratar as infecções pelo ZIKV, ou suas complicações decorrentes, tais como microcefalia e síndrome de Guillain-Barré.

Os produtos naturais continuam a desempenhar um papel relevante na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN e CRAGG, 2020). Portanto, a busca por constituintes bioativos de plantas, que possam ser candidatos potenciais ao desenvolvimento de fármacos para tratar infecções pelo ZIKV têm relevância inequívoca. Plantas ricas em polifenóis, triterpenos e esteroides, entre outras substâncias, foram avaliados no presente trabalho, visto que substâncias dessas classes já foram relatadas na literatura por exercerem atividade frente ao ZIKV, em diferentes modelos experimentais (BYLER et al., 2016; ROY et al., 2017; VÁZQUEZ-CALVO et al., 2017; LI et al., 2017a).

Assim, na presente tese relata-se a identificação de produtos naturais com potencial atividade antiviral frente ao ZIKV a partir da triagem de extratos vegetais *in vitro*, bem como os estudos fitoquímicos empreendidos para isolar e identificar os constituintes bioativos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar produtos naturais com potencial atividade antiviral frente ao ZIKV a partir da triagem de extratos vegetais e realizar o estudo fitoquímico de espécies ativas selecionadas.

2.2 Objetivos específicos

1. Realizar levantamento quimiosistemático de plantas que contêm polifenóis, triterpenos e esteroides, cujos extratos estão disponíveis na extratoteca do Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG.
2. Avaliar a citotoxicidade dos extratos das plantas selecionados em “1” em cultura de células Vero CCL-81;
3. Avaliar *in vitro* a atividade antiviral dos extratos não citotóxicos identificados em “2” em cultura de células Vero CCL-81 infectadas com ZIKV;
4. Avaliar a citotoxicidade dos extratos das plantas selecionados em “2” em cultura de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y);
5. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos ativos identificados em “3” em culturas de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) infectados pelo ZIKV;
6. Determinar o índice de seletividade dos extratos com maior atividade identificados em “4” frente ao ZIKV em células SH-SY5Y;
7. Avaliar o mecanismo de ação preliminar dos extratos selecionados em cultura de células Vero CCL-81;
8. Realizar a desreplicação por UPLC-DAD-ESI-MS/MS e o estudo fitoquímico dos extratos mais ativos identificado em “4”, utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas usuais, visando isolar e identificar os constituintes bioativos;
9. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das frações e substâncias isoladas em “7” em culturas de células Vero CCL-81 e/ou SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV, em concentrações não citotóxicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 História e epidemiologia do ZIKV

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus emergente. Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos, e alguns deles podem causar doenças em humanos. Alguns arbovírus se disseminaram globalmente, como os vírus da Zika, Dengue e Chikungunya. O termo arbovírus abrange grupos de vírus que têm padrões genéticos e formas de transmissão semelhantes; dessa forma, as informações obtidas para um vírus podem potencialmente ser utilizadas em estudos de prevenção e controle de outros vírus (JONES et al., 2020). O ZIKV apresenta relação genética e sorológica com outros representantes do gênero *Flavivirus* de importância em saúde pública, tais como o vírus da Dengue, Febre Amarela e Oeste do Nilo (FAYE et al., 2014).

O ZIKV foi descoberto após pesquisas científicas sobre o ciclo enzoótico do vírus da febre amarela (YFV) e de outros arbovírus desconhecidos na floresta Zika em Uganda, África (FERRARIS et al., 2019). O ZIKV foi inicialmente identificado em abril de 1947, no soro de um macaco do gênero *Rhesus* que habitava a floresta Zika, e também a partir de mosquitos *Aedes africanus* em janeiro de 1948, na mesma floresta (DICK et al., 1952; FEITOSA et al., 2016). O primeiro relato de infecção em humanos ocorreu na Nigéria, em 1953, em três pacientes com sintomas característicos, sendo isolado o vírus em um paciente e nos outros dois foram detectados anticorpos contra o ZIKV (MACNAMARA, 1954). Cerca de 20 anos depois, Fagbami (1979) relatou que aproximadamente 40% da população nigeriana possuíam anticorpos para o ZIKV. Desde sua descoberta até 2007, apenas casos esporádicos de infecção pelo ZIKV foram relatados, com manifestações clínicas leves em pacientes. A primeira epidemia pelo ZIKV ocorreu na ilha de Yap, na Micronésia, resultando na infecção de aproximadamente 73% da população local (DUFFY et al., 2009; FAYE et al., 2014), seguida por novos surtos epidêmicos na Polinésia Francesa em 2013 (~28.000 casos) e 2014, onde foi estimado que aproximadamente 32 mil pessoas apresentaram infecção sintomática pelo ZIKV (CAO-LORMEAU et al., 2014). Casos humanos também foram relatados em ilhas do Pacífico, pertencentes ao Chile (MUSSO et al., 2014; FEITOSA et al., 2016). A Figura 1 mostra áreas geográficas no mundo nas quais foram registradas infecções em humanos por ZIKV, de 2007 a 2016.

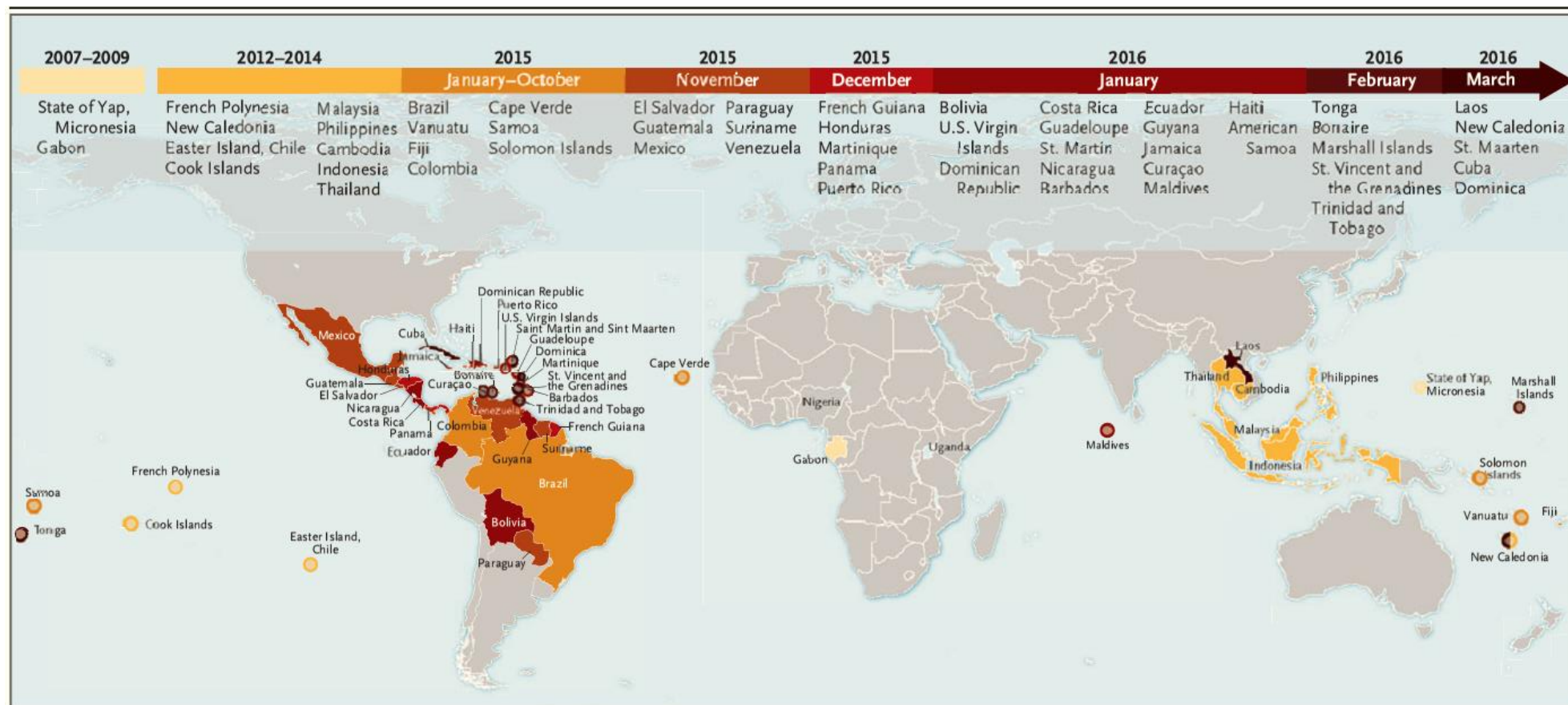


Figura 1. Áreas com infecções humanas pelo *Zika virus*, relatadas entre 2007 e 2016. Fonte: Petersen e colaboradores (2016).

O surto de ZIKV no Brasil teve início em 2015 (Figura 2) na região nordeste, seguido do Rio de Janeiro, São Paulo e outros estados, embora alguns casos já tivessem sido relatados no final de 2014 (CARDOSO et al., 2015). Análises filogenéticas e moleculares sugerem que a introdução do ZIKV no Brasil possa ter ocorrido já em 2013 (FARIA et al., 2016). Outros estudos sugerem que o ZIKV foi introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo de 2014, ou em um evento internacional de canoagem (MUSSO et al., 2015). Entretanto, apenas no segundo semestre de 2015 se observou aumento na prevalência de microcefalia em recém-nascidos, assim como no número de casos de Síndrome da Guillain-Barré (SGB) em adultos, no Brasil (FEITOSA et al., 2016). Cabe destacar que uma análise retrospectiva dos dados coletados no surto de ZIKV na Polinésia Francesa, em 2013-2014, mostrou associação do vírus à microcefalia e SGB (CAUCHEMEZ et al., 2016).

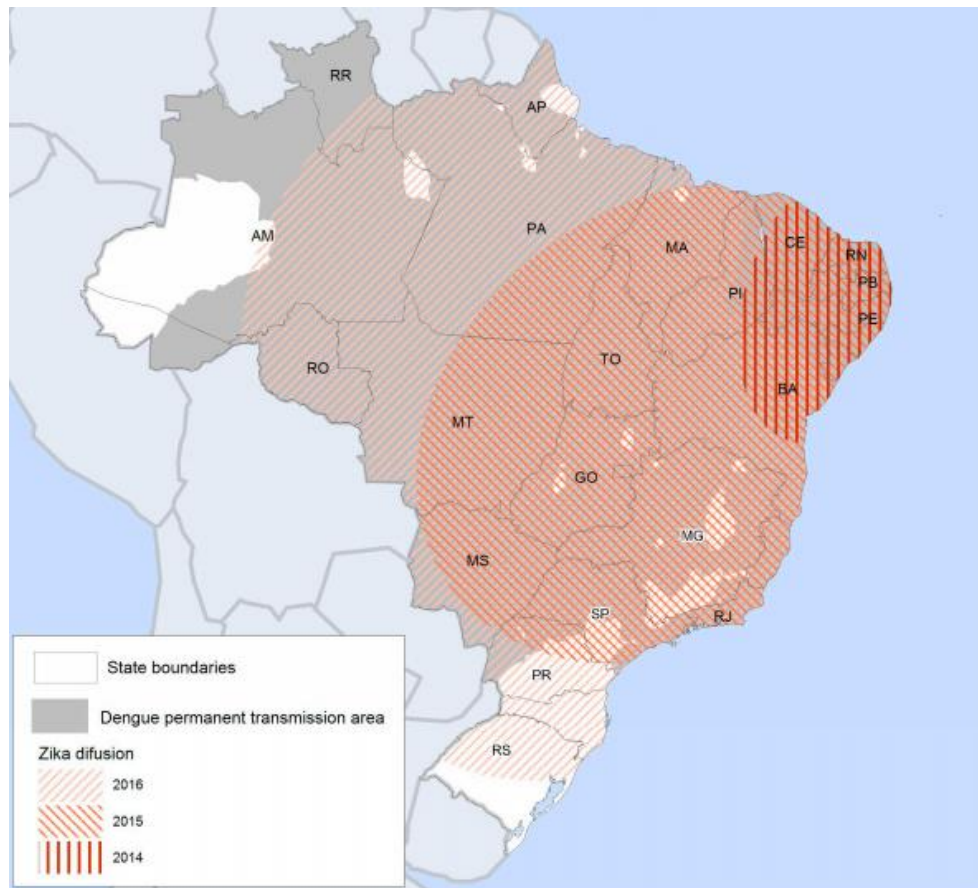


Figura 2. Infecção humana por *Zika virus* no Brasil. Fonte: Lowe e colaboradores (2018).

Na América Latina, o maior número de casos suspeitos e confirmados pelo ZIKV de janeiro de 2015 a março de 2017 foram relatados no Brasil (346.475 casos; 46% do total de casos no mundo), seguido da Colômbia (107.206; 14% dos casos) e Venezuela (62.200; 8% dos

casos) (HILLS et al., 2017). Especificamente, o primeiro caso de infecção pelo Zika confirmado no Brasil ocorreu em maio de 2015 (ZANLUCA et al., 2015) e, desde então, a infecção pelo ZIKV tem sido associada a complicações neurológicas graves, em bebês nascidos de mães infectadas (BRASIL et al., 2016) e adultos (CAO-LORMEAU et al., 2016). Os casos de microcefalia em recém-nascidos tiveram seu ápice em 2015, na região nordeste do Brasil, seguido por disseminação nas regiões sul e oeste do país. A partir de outubro de 2015, especialistas de Recife levantaram a hipótese da associação entre infecção por ZIKV na gravidez e microcefalia (LOWE et al., 2018).

As diversas formas de acometimento da infecção pelo ZIKV no sistema nervoso central em recém-nascidos são classificadas como síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV (SCZ), que representa um conjunto de anomalias fetais, não limitadas apenas à microcefalia, mas também a deficiências cognitivas, sensoriais e motoras (MOORE et al., 2017). Um balanço epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde mostrou que entre 2015 e 2019 foram confirmados 3.474 casos de SCZ no Brasil, sendo 954 em 2015, 1.927 em 2016, 369 em 2017, e 178 em 2018. Em 2019, houve 55 casos confirmados, dos quais 29 foram de recém-nascidos ou crianças nascidas neste ano, e três evoluíram para óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Segundo o Ministério da Saúde (2022a), foram notificados 2.118 casos prováveis de ZIKV no Brasil entre as semanas epidemiológicas 1 a 14 de 2022 (taxa de incidência 0,99 caso/100 mil habitantes). Em relação a 2021, os dados representam um aumento de 53,9% no número de casos do país. Entre janeiro e abril de 2022, não houve registro de óbitos confirmados por ZIKV no país.

Entre os anos de 2015 e 2021 foram notificados ao Ministério da Saúde 20.444 casos suspeitos de SCZ, dos quais 3.662 foram confirmados para alguma infecção congênita. Do total de casos confirmados, 1.834 foram classificados como SCZ e 246 indivíduos vieram a óbito, enquanto 3.017 casos confirmados para alguma infecção congênita permanecem em investigação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022b). Muito embora o período de emergência tenha sido encerrado, novos casos de infecções por ZIKV e de SCZ continuam ocorrendo no país, mas a pandemia em curso de SARS-CoV-2, o desmantelamento das políticas de saúde públicas e do programa de saúde da família provavelmente causa um atraso ou subnotificação do número atual de casos.

3.2 A família *Flaviviridae* e o gênero *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* (do latim *flavus*, que significa amarelo) é composta por quatro gêneros: *Flavivirus* (com 53 espécies); *Hepacivirus* (com 14 espécies); *Pegivirus* (com 11

espécies) e *Pestivirus* (com 4 espécies) (HASAN et al., 2018; NEUFELDT et al., 2018). Várias espécies de *Hepacivirus* e *Flavivirus* têm impacto substancial na saúde humana (NEUFELDT et al., 2018). Os membros da família *Flaviviridae* compartilham semelhanças morfológicas, na organização genômica e nas estratégias de replicação (KNIPE e HOWLEY, 2013).

Os vírus desta família são envelopados, com genoma de RNA constituído por 9.000 a 13.000 pares de bases (SIMMONDS et al, 2017). Os genomas desses vírus são RNAs não segmentados de fita simples positiva, com aproximadamente 9,2–11; 12,3–13; 8,9–10,5 e 8,9–11,3 kilobases (kb) para membros dos gêneros *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*, respectivamente. As partículas virais dos *Flavivirus* que infectam mamíferos são icosaédricas, envoltas por lipídios e possuem genoma de ~11 kb. O gênero *Flavivirus* pode ser subdividido em vírus transmitidos por mosquitos, vírus transmitidos por carrapatos e aqueles que não usam vetores artrópodes (HASAN et al., 2018). Este gênero é constituído por mais de 73 vírus, incluindo o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da Dengue (DENV), o vírus do Nilo Ocidental (WNV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (APTE-SENGUPTA et al., 2014; DAEP et al., 2014).

Apesar da disponibilidade de vacinas contra os vírus YFV, JEV e TBEV, as doenças provocadas por esses patógenos ainda prevalecem em todo o mundo. Entretanto, vacinas ou terapias contra os demais *Flavivirus* ainda não estão disponíveis e a prevenção contra as picadas dos mosquitos vetores continua sendo a principal forma de defesa contra alguns desses vírus (APTE-SENGUPTA et al., 2014).

3.3 O genoma do ZIKV e ciclo de multiplicação viral

Dados de soroprevalência sugerem a existência de três linhagens reconhecidas do ZIKV: africana, asiática e americana. Acredita-se que o vírus detectado na África e na Ásia, na década de 1950, tenha se distribuído para o Pacífico e para as Américas a partir de 2013 (FERRARIS et al., 2019).

De maneira semelhante a outras espécies de *Flavivirus*, o Zika é um vírus de RNA de fita simples sentido positivo, apresentando aproximadamente 10,8 kb, composto por duas regiões não-codificadas 3' e 5', três proteínas estruturais (capsídeo, pré-membrana/proteína e envelope) responsáveis pela estrutura da partícula viral, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que auxiliam na replicação e empacotamento do genoma viral (MUSSO e GUBLER, 2016; ROMBI et al., 2020) (Figura 3). Resumidamente, as funções das proteínas não estruturais, essenciais para replicação e infecção viral, são: NS1, envolvida na replicação do RNA e montagem das partículas; NS2A, replicação de RNA e

evasão imunológica; NS2B, cofator de NS3; NS3, principal protease viral; NS4A, cofator de NS3; NS4B, replicação de RNA e evasão imunológica; e NS5, RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) associada à síntese e modificação de RNA (HASAN et al., 2018). Geralmente, as proteínas estruturais, as proteínas não estruturais e o ciclo de replicação viral constituem os alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos com atividade antiviral.

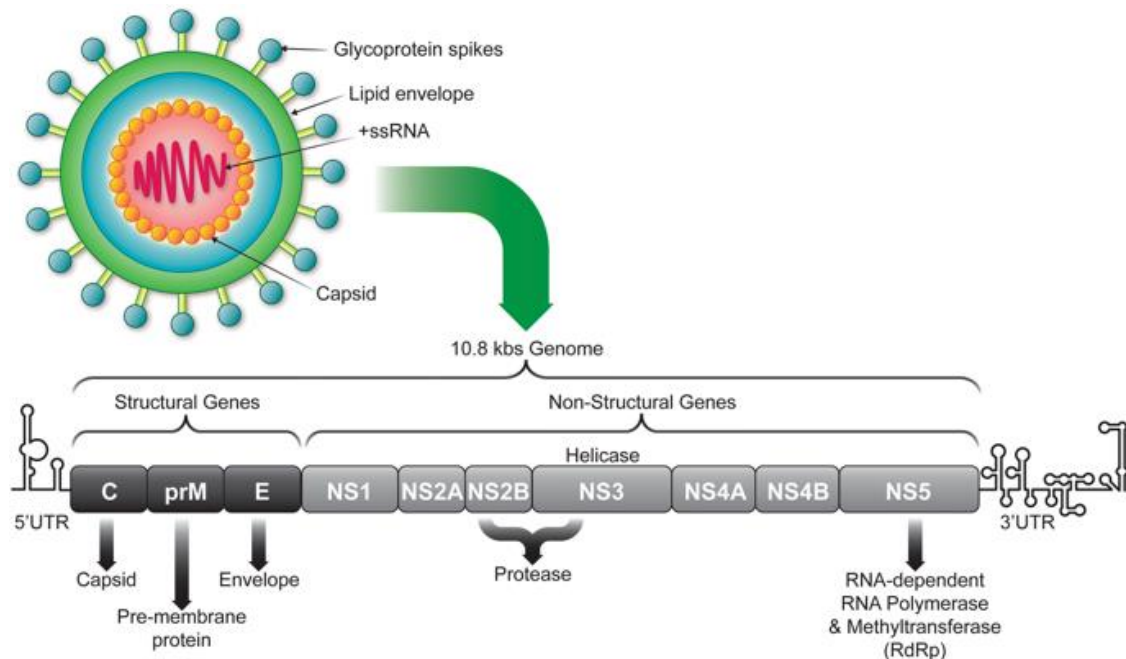


Figura 3. Genoma do *Zika virus*. Proteínas estruturais: (C) capsídeo, (prM) proteína de pré-membrana e (E) envelope, e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O genoma consiste em ~ 10,8 kb, contendo regiões não traduzidas 5'UTR de ~ 100 nucleotídeos e 3'UTR de ~ 420 nucleotídeos. Fonte: Rombi e colaboradores (2020).

A partícula viral madura tem diâmetro de 50 nm e possui 180 cópias das proteínas E e M incorporadas na membrana viral (SIROHI e KUHN, 2017). Segundo Kostyuchenko e colaboradores (2016), a proteína E é a principal proteína envolvida na ligação e fusão de receptores do ZIKV. A proteína M é uma proteína pequena que está oculta sob a camada de proteína E. As proteínas E e M estão organizadas em simetria icosaédrica, composta por 60 unidades repetidas, e cada unidade assimétrica contém três proteínas E individuais (moléculas A, B e C) (Figura 4c). As proteínas E são organizadas como dímeros, com três dímeros paralelos entre si. O dímero DI atua como uma ponte entre os dímeros DII e DIII. A ponta de DII contém a alça de fusão, que interage com a membrana endossômica durante a fusão. A dobradiça DI-DII é considerada importante para acionar o DII e expor o loop de fusão durante a entrada na célula hospedeira. A proteína E do ZIKV possui níveis de sequências homólogas (variando de 40 a 58%) com outros flavivírus; entretanto, suas contribuições para a patologia do ZIKV não

são claras (KOSTYUCHENKO et al., 2016). Na proteína E do ZIKV, existe apenas um local de glicosilação nos resíduos de asparagina 154 (Asn¹⁵⁴), enquanto o DENV possui dois (Asn⁶⁷ e Asn¹⁵³) (ZHANG et al., 2013). O local de glicosilação de Asn⁶⁷ em DENV demonstrou ser crucial para a ligação ao receptor DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific ICAM-3-Grabbing Non Integrin*) em células dendríticas (POKIDYSHEVA et al., 2006). Essas diferenças podem gerar uma variação no tropismo celular do ZIKV e contribuir para os resultados da doença (SIROHI et al., 2016).

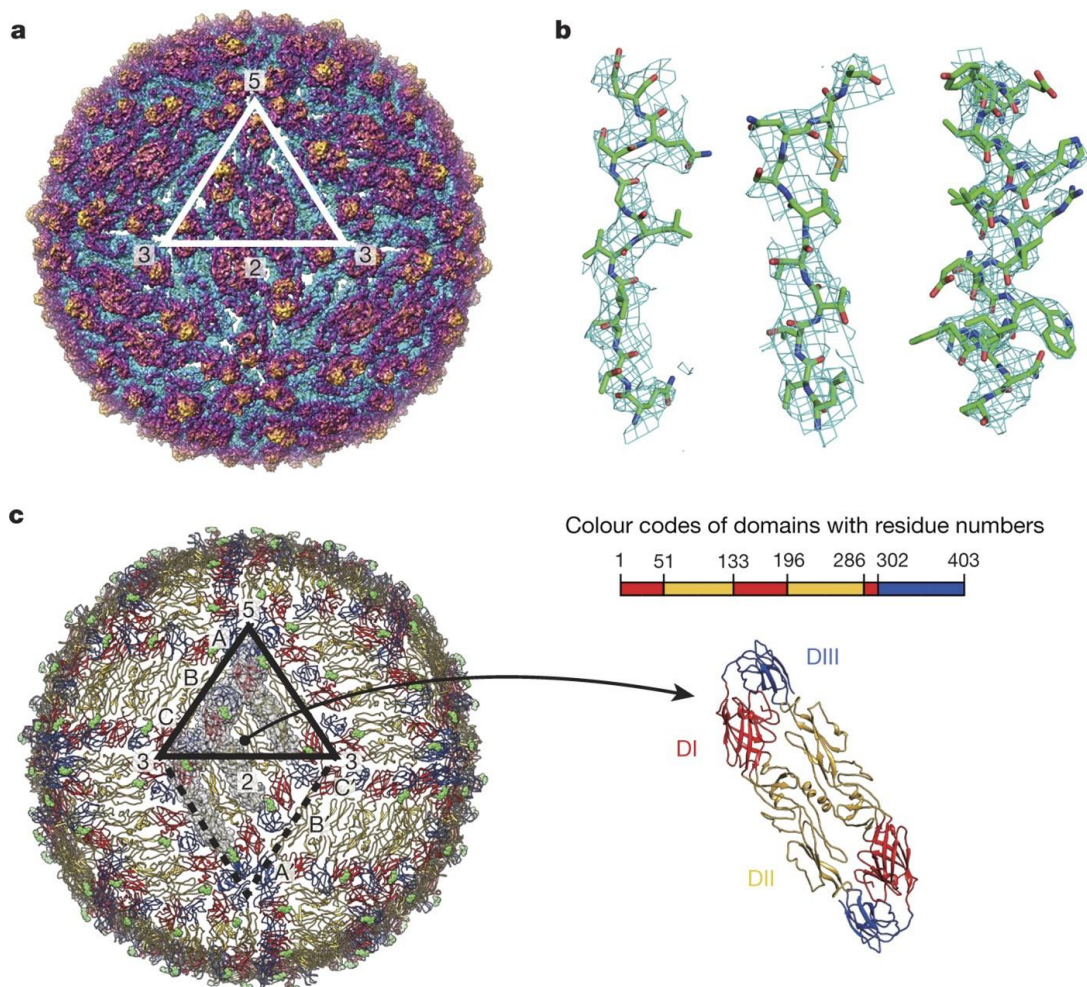


Figura 4. Estrutura de criomicroscopia eletrônica do *Zika virus*. a) partícula viral; b) estrutura da proteína E; c) arranjo da proteína E na superfície viral. Os locais de glicosilação Asn154 são mostrados como esferas verdes. As três proteínas E individuais (A, B e C) em uma unidade assimétrica (triângulo preto) são indicadas por superfícies transparentes. Adaptado de: Kostyuchenko e colaboradores (2016).

O ciclo de multiplicação do ZIKV (Figura 5) ainda não foi completamente elucidado; entretanto, seu ciclo é semelhante ao de outros *Flavivirus* (MUSSO e GUBLER, 2016). O ciclo

inicia-se com a adsorção do vírus à célula hospedeira, em um processo conhecido como endocitose mediada por receptor. Até o momento, os receptores AXL e Tyro3, ambos pertencentes à família de receptores TAM (receptores de tirosina quinase), são os mais conhecidos em mediar este processo (SIROHI e KUHN, 2017; ROMBI et al, 2020). Após a adsorção da partícula pela célula hospedeira, o ciclo ocorre inteiramente no citoplasma (HASAN et al., 2018). Após a acidificação do endossoma e alterações conformacionais subsequentes da proteína E (envelope), o RNA é liberado no citoplasma da célula hospedeira e em seguida traduzido como uma poliproteína que, na sequência, é clivada por proteases virais e do hospedeiro, gerando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. As proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação, montagem e antagonização da resposta imune inata do hospedeiro. A proteína C (capsídeo) empacota os genomas virais transcritos que, juntamente com outras proteínas estruturais, reúnem-se na superfície do retículo endoplasmático como vírions imaturos. Após a montagem e maturação, esses vírions são transportados pelo complexo de Golgi até a membrana plasmática. Durante o transporte ocorre a clivagem da proteína prM (membrana) em peptídeo pr e proteína M, por meio de proteases furinas do hospedeiro. Na sequência, os vírions infecciosos são liberados da célula via exocitose (ROMBI et al., 2020).

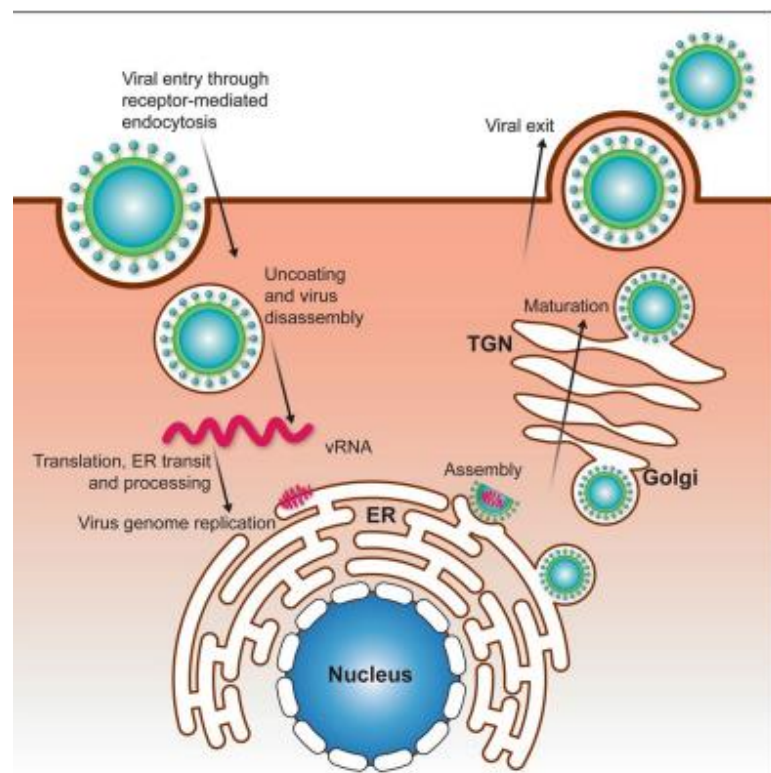


Figura 5. Ciclo de multiplicação do *Zika virus*. O vírus adsorve na célula por endocitose mediada por receptores, na sequência é realizada a síntese de RNA, seguindo-se a replicação do genoma e a montagem das partículas infecciosas do vírus, e por fim o vírus é liberado da célula e passa a infectar uma nova célula. Adaptado de: Rombi e colaboradores (2020).

3.4 Aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV

Sintomas clínicos agudos da infecção pelo ZIKV em adultos são semelhantes aos de outros arbovírus como DENV e CHIKV (ROMBI et al., 2020). Cerca de 75% a 80% dos casos de infecção pelo ZIKV apresentam-se assintomáticos. As infecções sintomáticas, com período de incubação variando de 3 a 12 dias (RIBEIRO et al., 2017), são caracterizadas por erupção cutânea maculopapular, febre, cefaleia, artralgia, mialgia e conjuntivite (OEHLER et al., 2014; BYLER et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016; VENTURA et al., 2016). A apresentação clínica da infecção congênita pelo ZIKV é variável, incluindo perda neurossensorial auditiva, deficiência visual, artrogripose e microcefalia (PESSOA et al., 2018).

A microcefalia consiste em um distúrbio neurológico que afeta o crescimento cerebral, no qual o perímetro cefálico é menor quando comparado com o tamanho normal esperado para a mesma idade, sexo e raça (RIBEIRO et al. 2017) (Figura 6). Há uma redução do volume cerebral e, muitas vezes, deficiências intelectuais e/ou motoras (CAUCHEMEZ et al., 2016).

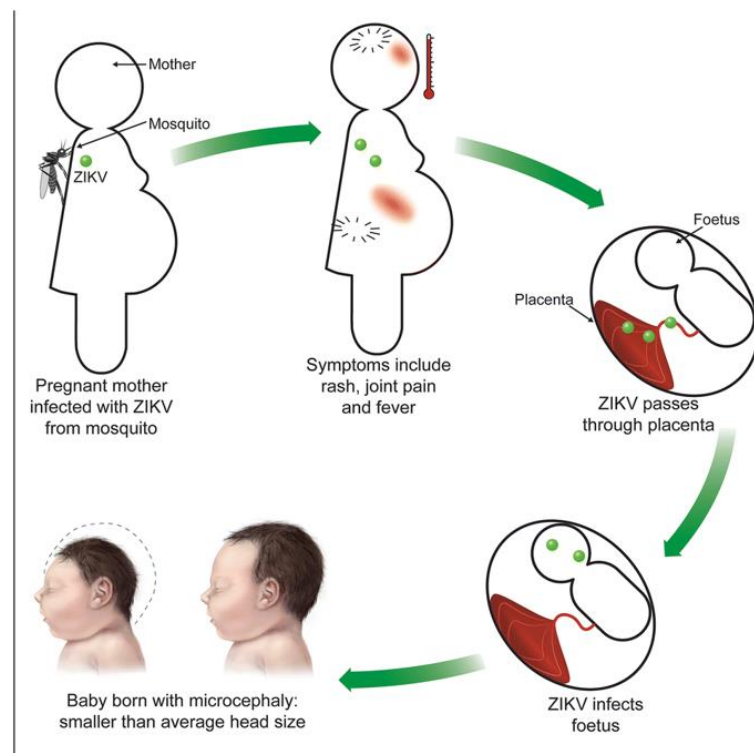


Figura 6. Infecção pelo *Zika virus* em mulheres grávidas. Representação esquemática dos eventos que levam ao desenvolvimento da microcefalia fetal. Fonte de algumas imagens: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/images/microcefalia-comparação-500px.jpg>. Fonte: Rombi e colaboradores (2020).

O risco de transmissão vertical existe durante toda a gravidez para mães sintomáticas e assintomáticas (SHAPIRO-MENDOZA et al., 2017), embora as manifestações mais graves

estejam associadas a infecções no primeiro e no segundo trimestres (BRASIL et al., 2016). Anormalidades congênitas associadas à infecção pelo ZIKV também foram descritas na Polinésia Francesa (por análise retrospectiva) e em outros países da América Latina (CAUCHEMEZ et al., 2016). Segundo Miner e colaboradores (2016), as cepas de ZIKV na Polinésia Francesa e na América Latina compartilham o potencial de causar doenças durante a gravidez. A transmissão vertical do ZIKV e sua capacidade de causar danos no cérebro em desenvolvimento são semelhantes ao encontrado em infecções virais pelo *Rubella virus*, citomegalovírus, *herpes virus*, e vírus da imunodeficiência humana, bem como na toxoplasmose (RIBEIRO et al. 2017).

Infecções pelo ZIKV em fetos e bebês podem resultar em calcificações cerebrais, microcefalia e outras malformações congênitas associadas à SCZ. Vários estudos sugerem que, mesmo em bebês considerados normocefálicos ao nascimento, a infecção congênita pelo ZIKV causa complicações, tais como atrasos no desenvolvimento neurológico, perda da acuidade visual e auditiva, e dificuldades no domínio linguístico (FAIÇAL et al., 2019; NIELSEN-SAINES et al., 2019; BARAN et al., 2019). É necessário acompanhamento de médio e longo prazo com cuidadosas avaliações padronizadas para determinar os resultados gerais nos bebês expostos, incluindo taxas de atraso no desenvolvimento, deficiências auditivas e visuais, convulsões e distúrbios alimentares, bem como resultados posteriores, como dificuldades de aprendizagem (LOWE et al., 2018). Portanto, as alterações causadas pelo ZIKV em indivíduos afetados podem gerar complicações futuras que necessitam ser investigadas (COYNE et al., 2016).

Em adultos, a manifestação neurológica mais importante é conhecida como síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma neuropatia periférica associada a quadros de paralisia progressiva (LI et al., 2019). Ela é causada por uma estimulação inadequada/exacerbada do sistema imune do hospedeiro, associada a uma resposta imune celular e humoral contra componentes do sistema nervoso periférico, gerando lesões na mielina ou no axônio dos neurônios, caracterizando o quadro clínico da doença de fraqueza, paralisia e até complicações respiratórias (WILLISON et al., 2016).

3.5 Transmissão e patogênese

Dois ciclos de transmissão pelo ZIKV ocorrem na natureza. O ciclo silvestre, onde o vírus circula entre primatas não humanos e espécies silvestres de *Aedes* spp; e um ciclo urbano, onde o vírus é transmitido entre humanos e por espécies de *Aedes* spp (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). A transmissão do ZIKV ocorre através da picada da fêmea do

mosquito *Aedes* ssp. *O. A. aegypti*, altamente presente nos centros urbanos e periurbanos, contribui para a disseminação nas regiões tropicais e subtropicais, e o *A. polynesiensis*, encontrado nas ilhas Samoa e Fiji, é responsável pela transmissão para outras ilhas da Polinésia e do oceano Pacífico (IOOS et al., 2014; ROMBI et al., 2020). Também foi relatada a transmissão do ZIKV pelo mosquito *A. albopictus*, que possui ampla distribuição geográfica, incluindo regiões tropicais e subtropicais (ROMBI et al., 2020).

Outros mosquitos também podem se infectar pelo ZIKV, mas sua contribuição para a disseminação da doença ainda necessita ser elucidada. No estudo de Gutiérrez-Bugallo e colaboradores (2019) foram descritas 31 espécies de mosquitos capturados na natureza, infectados pelo ZIKV, os quais pertencem a cinco gêneros: *Aedes* (22 espécies), *Culex* (4 espécies), *Anopheles* (2 espécies), *Eretmapodites* (2 espécies) e *Mansonia* (1 espécie).

Além da transmissão clássica via picada por mosquitos do gênero *Aedes*, outras formas de transmissão foram descritas na literatura (Figura 7): como transfusão sanguínea, perinatal e pela urina; porém, não há, até o momento, evidências de transmissão pelo aleitamento materno (RIBEIRO et al., 2017). O ZIKV é o único membro do gênero *Flavivirus*, cuja transmissão ocorre também por via sexual e transplacentária (MUSSO et al., 2015; ZHANG et al., 2019; ROMBI et al., 2020).

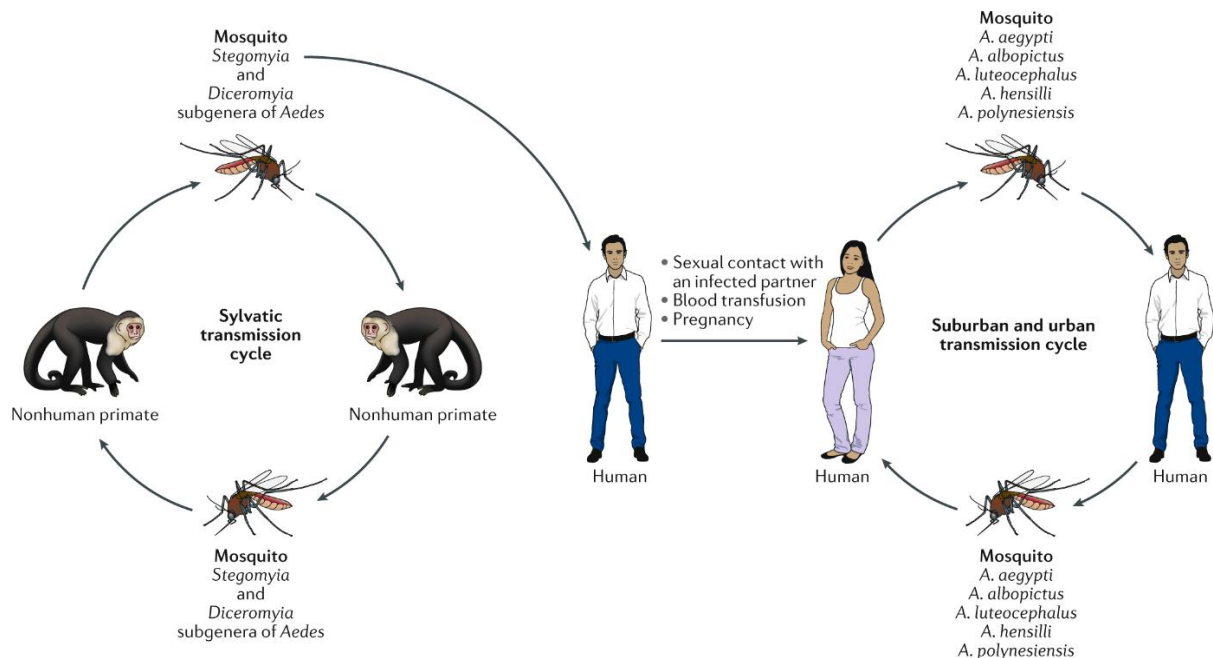


Figura 7. Ciclos de transmissão do Zika vírus. Na África, ele é transmitido entre primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* (subgêneros *Stegomyia* e *Diceromyia*) no ciclo silvestre, onde infecções esporádicas podem ocorrer. Nos ambientes urbanos e periurbanos, o vírus é transmitido para humanos principalmente por mosquitos *Aedes aegypti*, mas a transmissão por outras vias também pode ocorrer, tais como sexual, com um parceiro infectado, transfusão sanguínea e durante a gravidez. Fonte: Kurscheidt e colaboradores (2019).

O ciclo infeccioso começa quando espécies de *Aedes* ingerem sangue infectado pelo ZIKV, iniciando um processo de replicação nas células epiteliais do intestino médio e alcançando as glândulas salivares do mosquito, processo que dura em torno de 5 a 10 dias. A partir desse momento existe a possibilidade de transmissão do ZIKV para indivíduos saudáveis (RIBEIRO et al., 2017).

Após a transmissão ao hospedeiro humano, é provável que o ZIKV entre nas células alvo através de receptores celulares, como ocorre com outros flavivírus (ROMBI et al., 2020). Inicialmente o ZIKV infecta os fibroblastos da derme, queratinócitos da epiderme e células dendríticas imaturas (HAMEL et al., 2015). Os queratinócitos e fibroblastos contêm receptores AXL, Tyro3 e, em menor extensão, TIM-1 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1*), que podem servir como fatores de ligação ou receptores para o ZIKV. As células de Langerhans contêm DC-SIGN, que também pode servir como um receptor para a entrada de vírus (CHAN et al., 2016). Essa infecção nos fibroblastos induz vias de ativação de genes de receptores do tipo TOLL (TLRs) (principalmente receptor tipo toll-3: TLR3) (Figura 8), gene induzível por ácido retinóico I (RIG-1), gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA5), os genes estimulados por interferon (ISGs) como 2'-5' oligoadenilato sintetase 2 (OAS2), ISG15 (*Interferon-Stimulated Gene 15*) e MX1 (*MX dynamin like GTPase 1*), caracterizando um aumento na expressão de interferon beta (IFN β), além das quimiocinas CXCL10, CXCL11 e CCL5 (HAMEL et al., 2015). A via de sinalização do TLR3 faz parte da resposta imune inata e cria um estado antiviral na célula infectada. Esta via leva à ativação de fatores de transcrição, como fatores reguladores de interferons IRF-3, IRF7 e fator nuclear kappa B (NF-kB), por fim induzindo a produção de IFNs dos tipos 1 e 2, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e ISGs (WANG et al., 2004). Os interferons dos tipos I e II podem suprimir a carga viral das células infectadas. Além disso, o ZIKV é capaz de aumentar sua replicação pela indução de autofagia em células hospedeiras e, após replicação nessas células e nos linfonodos, o ZIKV pode se disseminar a partir dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para alcançar outros órgãos/tecidos (CHAN et al., 2016). A Figura 8 ilustra o processo de adsorção e ativação de vias intracelulares pelo ZIKV.

Portanto, é possível que os níveis de IFN λ 1 variem durante a gravidez ou entre indivíduos e isso determine as diferenças na ocorrência da infecção nos diferentes estágios da gestação; por sua vez, (3) Nowakowski e colaboradores (2016) sugeriram que o ZIKV, após atravessar a barreira placentária, infecta inicialmente células gliais radiais, que apresentam maior expressão de receptor AXL, sendo o mesmo disseminado por via linfática ou via líquido cefalorraquidiano. Ao destruir as células gliais radiais, progenitoras de todos os neurônios corticais, o ZIKV pode ocasionar microcefalia grave (NOWAKOWSKI et al., 2016).

Em geral, os *Flavivirus* tendem a ter tropismos celulares amplos e múltiplos fatores contribuem para os resultados patogênicos, incluindo resposta celular específica e acessibilidade tecidual (TANG et al., 2016a). Segundo Tang e colaboradores (2016b), o ZIKV é capaz de infectar células progenitoras neurais (NPCs) humanas derivadas de células tronco pluripotentes, levando ao aumento da morte celular e à desregulação do ciclo celular. Conforme mencionado anteriormente, a característica mais alarmante do ZIKV é seu tropismo por células do sistema nervoso, principalmente as células progenitoras neurais, levando ao comprometimento do desenvolvimento cerebral, que resulta em microcefalia e outros distúrbios neurológicos (OJHA et al., 2018). A microcefalia primária é causada pela depleção da glia radial (células-troncos neurais), devido à diferenciação prematura e/ou à morte em grande escala dessas células. O receptor AXL é um dos principais sítios moleculares envolvidos no processo de adsorção e infecção pelo ZIKV. Uma explicação para o maior tropismo do ZIKV pelo tecido cerebral é o seu elevado nível de expressão do receptor AXL, o que torna essas células particularmente suscetíveis à infecção pelo vírus (ROMBI et al., 2020).

O ZIKV é capaz de infectar diferentes tipos de células e tecidos (Figura 9), incluindo quase todos os tipos de células do encéfalo, a exemplo dos astrócitos, microglia, células endoteliais microvasculares do cérebro, pericitos, oligodendrócitos e neurônios (OJHA et al., 2018), bem como queratinócitos da pele e fibroblastos dérmicos humanos (MINER e DIAMOND, 2016). O ZIKV também infecta células dos olhos, incluindo a córnea e nervos ópticos, causando uveíte e até cegueira (OJHA et al., 2018). Além disso, o ZIKV é capaz de infectar testículos e o epidídimo de camundongos machos, o que provoca danos e infertilidade (MA et al., 2016). Também foi capaz de infectar mucosa vaginal de camundongos fêmeas (TANG et al., 2016a).

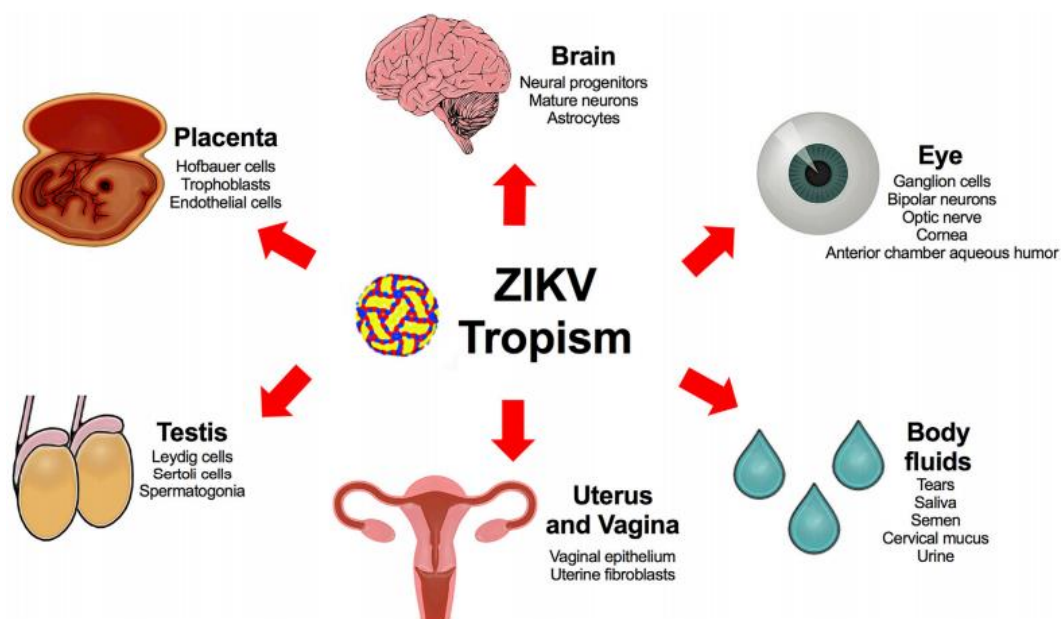


Figura 9. Tropismo do *Zika virus* para diferentes células e tecidos. Estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos mostraram que esse vírus foi detectado em diferentes células e tecidos: placenta (células de Hofbauer, trofoblastos e células endoteliais), cérebro (células progenitoras neurais, neurônios maduros e astrócitos), tecidos oculares (córnea, retina, nervo óptico e humor aquoso da câmara anterior), sistema reprodutivo (espermatogônia, células de Sertoli e Leydig, epitélio vaginal e fibroblastos uterinos), fluidos corporais (lágrimas, saliva, sêmen, muco cervical, lavado vaginal e urina). Fonte: Miner e Diamond (2017).

O ZIKV possui uma semelhança estrutural com o DENV e pode ocorrer reação cruzada dos anticorpos produzidos durante infecção por esses vírus. Essa reatividade cruzada pode ocorrer não só entre eles, mas também em outros membros do gênero *Flavivirus* (ROBBIANI et al., 2017). Sabe-se que durante uma infecção primária por DENV, o indivíduo desenvolve imunidade protetora contra o sorotipo infectante e proteção cruzada temporária contra os demais sorotipos (GUZMAN e HARRIS, 2015). Já numa infecção secundária, os anticorpos produzidos contra o sorotipo infectante primário podem vir a intensificar a infecção viral, via um fenômeno denominado “Intensificação da infecção dependente de anticorpos” (em inglês, *ADE*, *antibody-dependent enhancement*). Esses anticorpos podem formar imunocomplexos com o novo vírus, facilitando a infecção de células que expressam os receptores de imunoglobulinas (FcR) do tipo gama (Fc γ R), via interação com a porção Fc dos anticorpos. Assim, há um aumento no número de células infectadas, resultando em uma elevada carga viral e, conseqüentemente em maior resposta inflamatória, em comparação com indivíduos infectados na ausência desses anticorpos (KATZELNICK et al., 2017).

Durante a epidemia de ZIKV, os casos mais graves da doença ocorreram nas regiões onde circulam o DENV e seus sorotipos (LAZEAR e DIAMOND, 2017). Estudos mostraram

que os anticorpos anti-DENV podem exacerbar a infecção pelo ZIKV em modelo *in vitro* (CHARLES e CHRISTOFFERSON, 2016) e, reciprocamente, anticorpos anti-ZIKV podem intensificar a infecção por DENV em modelos *in vitro* e *in vivo* (STETTLER et al., 2016).

Componentes virais podem estar associados ao agravamento da doença causada pelo ZIKV. Xia e colaboradores (2018) relataram que a mutação no gene NS1, associada à chegada do vírus nas Américas, teria conferido ao ZIKV a capacidade de inibir a indução de IFN- β , conforme demonstrado pelos autores em modelos *in vitro* e *in vivo*, com aumento da capacidade da replicação viral e indução de neurovirulência em camundongos. A mutação no gene NS5 é comum a todas as cepas de ZIKV encontradas em países da América do Sul e Central, sendo essa mutação envolvida na replicação de novos vírions (LOGAN, 2016). Porém, ainda não estão bem esclarecidos os efeitos que essa mutação pode causar.

Dados utilizados na construção da árvore filogenética do ZIKV podem ser usados para estimar as taxas de mutação do vírus, que parece variar entre 12 a 25 mutações por ano, equivalente a 0,12% a 0,25% do RNA (LOGAN et al., 2016). A análise filogenética revelou que as cepas contemporâneas epidêmicas acumularam múltiplas substituições de seus ancestrais asiáticos (YUAN et al., 2017). Uma única substituição de serina-asparagina [Ser 139 \rightarrow Asn 139(S139N)] na poliproteína viral aumentou substancialmente a infectividade do ZIKV em células progenitoras neurais de humanos e camundongos, causando microcefalia mais grave nos fetos de camundongos, além de taxas de mortalidade mais altas nos camundongos neonatais. Os autores concluíram que, na análise evolutiva, essa substituição do S139N ocorreu antes do surto de 2013 na Polinésia Francesa, e foi mantida de forma estável durante a subsequente disseminação para as Américas. Essa adaptação tornou o ZIKV mais virulento, contribuindo para o aumento da incidência de microcefalia nas recentes epidemias (YUAN et al., 2017).

3.6 Diagnóstico e profilaxia

O diagnóstico de ZIKV é inicialmente realizado com base na avaliação clínica do paciente, o que é dificultado pela similaridade dos sintomas com aqueles de outras arboviroses endêmicas, a exemplo da Dengue e da Chikungunya (FAUCI e MORENS, 2016). O diagnóstico molecular é realizado por meio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), detectando especificamente o RNA viral em pacientes. Entretanto, o período de viremia do ZIKV é curto, dificultando sua identificação no sangue de pacientes após o desaparecimento dos sintomas (GOURINAT et al., 2015; CAMPOS et al., 2016). A pesquisa da presença do vírus no sangue e na saliva é limitada até o 7º dia após o início dos sintomas.

Após esse período pode-se utilizar como material de análise a urina, na qual o vírus permanece por mais de 30 dias após o início dos sintomas, ou o sêmen, em pacientes do sexo masculino, onde o vírus pode ser detectado num período de 3 a 8 semanas após o início dos sintomas. Testes sorológicos para detecção de IgM contra ZIKV costumam ser usados entre o 4º e o 5º dia após o início dos sintomas, permanecendo presentes por até 2 a 3 meses, semelhante ao observado para outros *Flavivirus* (RIBEIRO et al., 2017).

Atualmente, para a prevenção da síndrome do ZIKV preconiza-se o uso de medidas de barreira contra a picada do vetor (uso de repelentes, mosquiteiros, telas, roupas longas), a eliminação de possíveis criadouros de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, além de uso de preservativos para evitar a transmissão sexual do vírus (SCHULER-FACCINI et al., 2015; MOORE et al., 2017).

3.7 Terapêutica atual e desenvolvimento de agentes anti-ZIKV

A terapêutica da infecção por ZIKV é sintomática, sendo semelhante ao protocolo terapêutico da DENV, recomendando-se o uso de paracetamol para alívio da febre e anti-histamínicos para redução de pruridos (PAHO/WHO, 2015).

De acordo com a OMS, a pesquisa e o desenvolvimento de candidatos a fármacos são urgentes, visto que até o momento não há terapia e/ou vacina aprovados para tratar a infecção pelo ZIKV (YLIPISTO, 2017; FERRARIS et al., 2019). Também são necessários testes diagnósticos aprimorados, já que a infecção pelo ZIKV é difícil de ser diagnosticada e diferenciada clinicamente de outras infecções virais como Dengue e Chikungunya (FAUCI, 2017). O principal desafio para desenvolver um tratamento para infecção por ZIKV é encontrar um fármaco e/ou vacina que possa ser administrado a gestantes, que seja seguro e de baixo custo (FERRARIS et al., 2019).

Dentre as dificuldades encontradas para o desenvolvimento de vacinas e fármacos destacam-se: (a) ausência de conhecimento sobre os efeitos de reações cruzadas entre ZIKV e outros *Flavivirus*, e nem os impactos da vacinação nas infecções subsequentes por outros *Flavivirus*; (b) os fármacos contra o ZIKV devem ser seguros, principalmente em mulheres grávidas; (c) avaliação da eficácia de vacinas e fármacos contra o ZIKV nos ensaios clínicos de fases II a IV é dificultada devido ao declínio de casos de ZIKV (MASMEJAN et al., 2018; MASLOW, 2019) (d) a persistência do ZIKV em alguns locais, como olhos e testículos, representa um obstáculo significativo no desenvolvimento de uma vacina eficaz (SAGER et al., 2018), (e) o ZIKV é um vírus de RNA e, portanto, se replica rapidamente e é capaz de desenvolver resistência a compostos direcionados a proteínas virais; (f) o ZIKV possui alta taxa

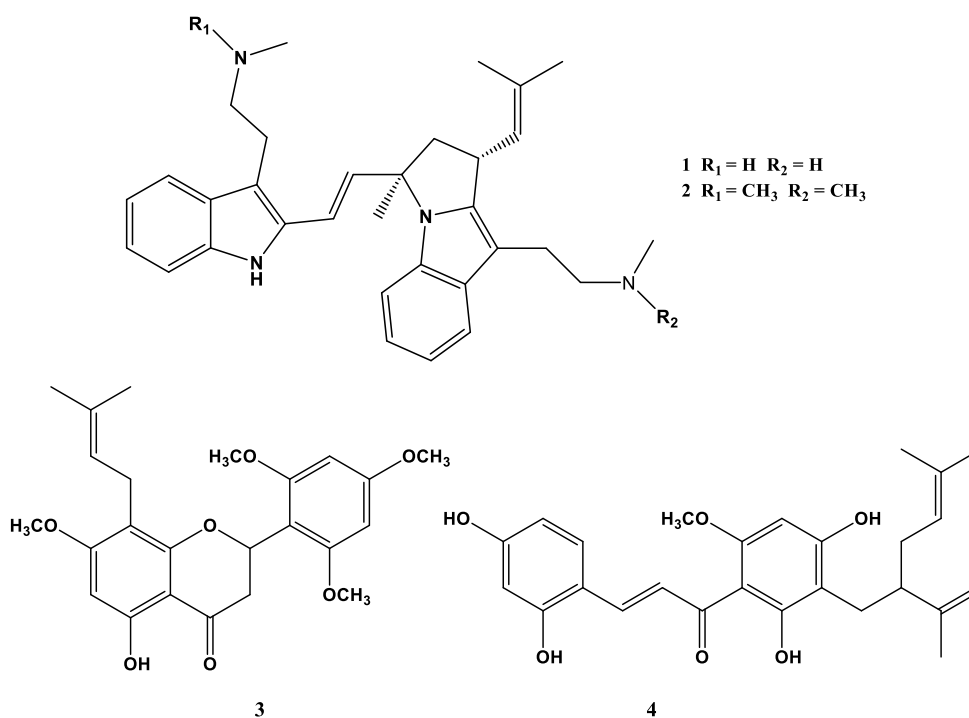
de mutação do seu RNA viral, favorecendo o desenvolvimento de cepas mutantes de escape, que são resistentes a fármacos que agem em proteínas virais (ELGNER et al., 2018), entre outras. Um alvo alternativo para a pesquisa de antivirais são as proteínas celulares do hospedeiro (fatores celulares) que não sofrem mutações durante a infecção, sendo essa estratégia menos propícia a ocorrência de resistência (SAGER et al., 2018).

Não foram encontrados, na literatura, até o momento, relatos de candidatos a fármacos em avaliação clínica para a terapia de infecções causadas pelo ZIKV (<http://clinicaltrials.gov>).

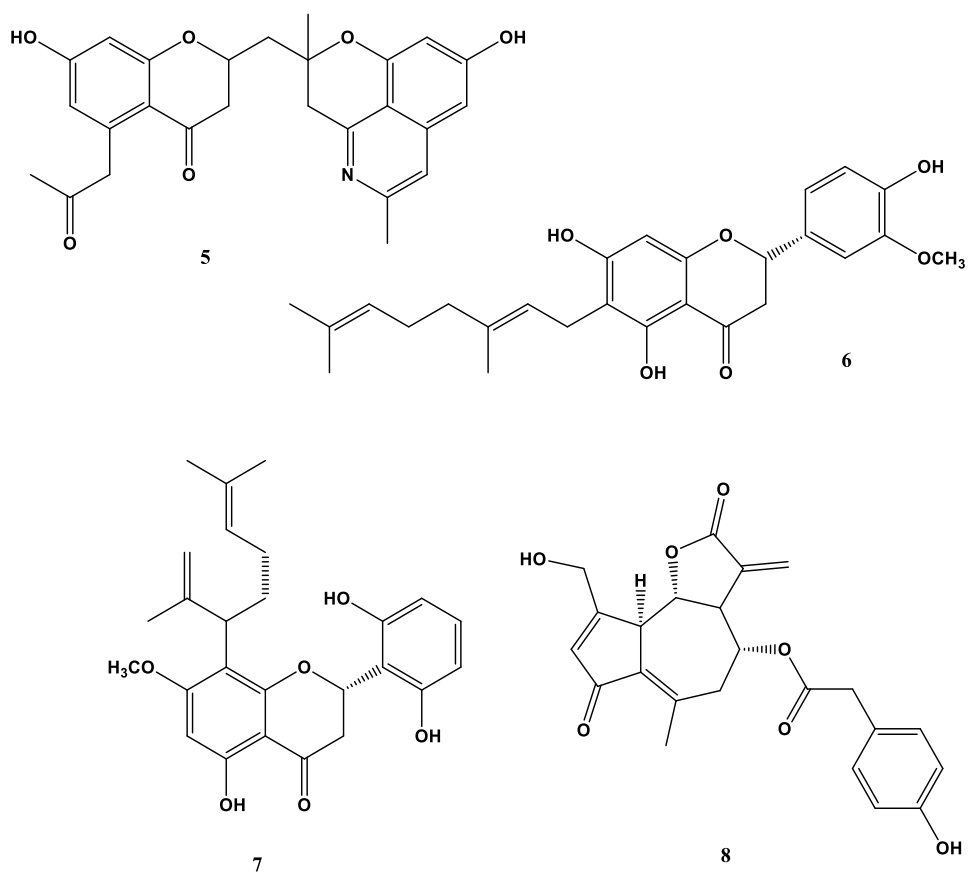
3.8 Espécies vegetais e produtos naturais ativos contra o ZIKV

Na sequência, são descritas substâncias que apresentam potencial atividade antiviral frente ao ZIKV, relatadas em estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

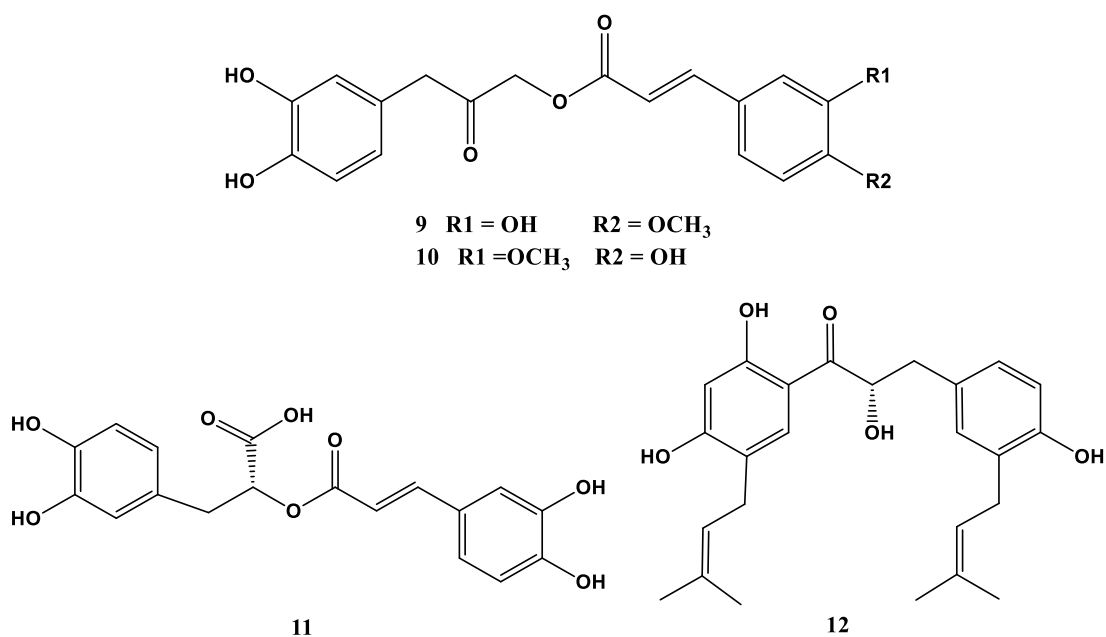
Em estudo *in silico* de Byler colaboradores (2016), os melhores ligantes de ancoragem molecular com as proteínas alvos do ZIKV foram polifenóis e alcaloides, que apresentaram alta afinidade pelos receptores proteicos. Os compostos que apresentaram excelentes propriedades de ancoragem para as proteases NS2B e NS3pro do ZIKV foram os alcaloides bis-indólicos flinderol A (**1**) e flinderol B (**2**), e os flavonoides angusticornina B (**3**) e curaridina (**4**).

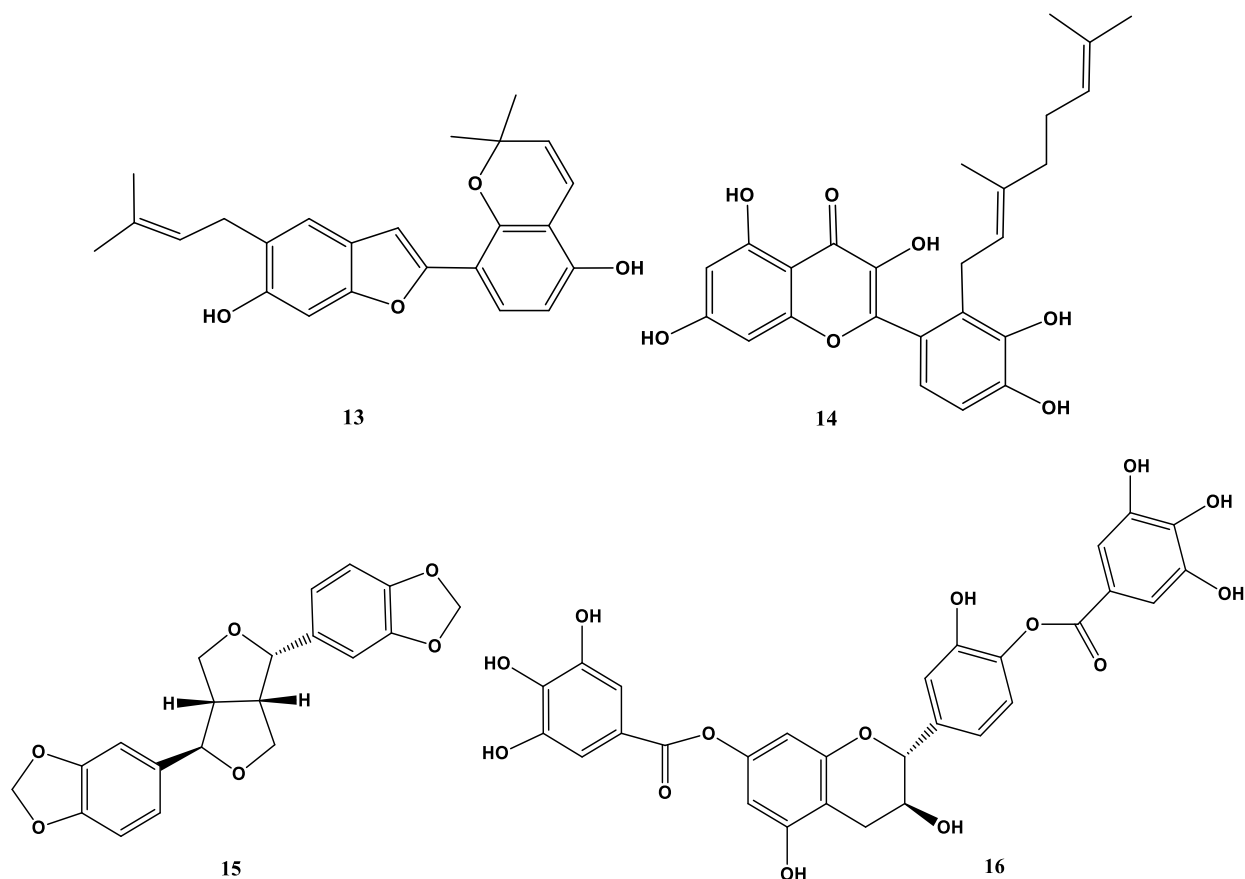


Ainda neste estudo *in silico*, as substâncias que apresentaram melhores propriedades de ancoragem molecular para a helicase NS3 do ZIKV foram o alcaloide isoquinolínico cassiarina D (**5**), os flavonoides 3'-*O*-metildiplacona (**6**) e exiguaflavanona A (**7**), além do sesquiterpeno lactucopicrina (**8**) (BYLER et al., 2016).

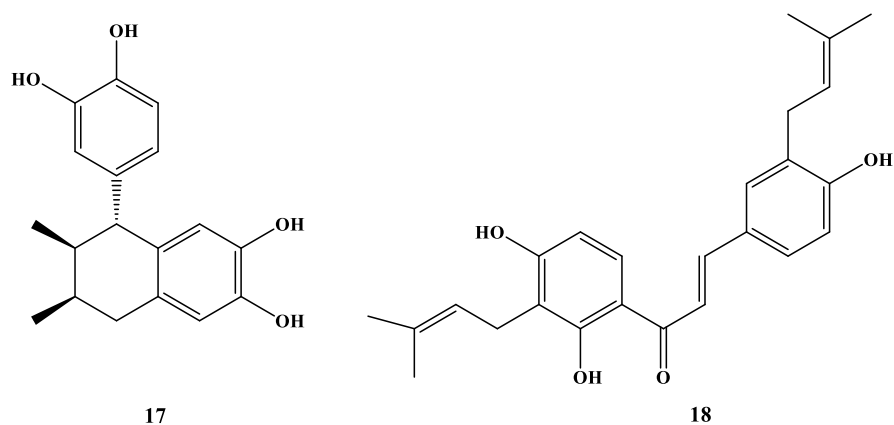


Já para a metiltransferase NS5 do ZIKV, as substâncias que apresentaram excelentes propriedades de ancoragem foram os fenólicos cimicifol (9), cimiracemato B (10) e ácido rosmarínico (11), as chalconas kanzonol Y (12) e curaridina (4), a aurona kanzonol V (13), a flavona solofenol D (14), e a lignana (-)-asarinina (15) (BYLER et al., 2016).

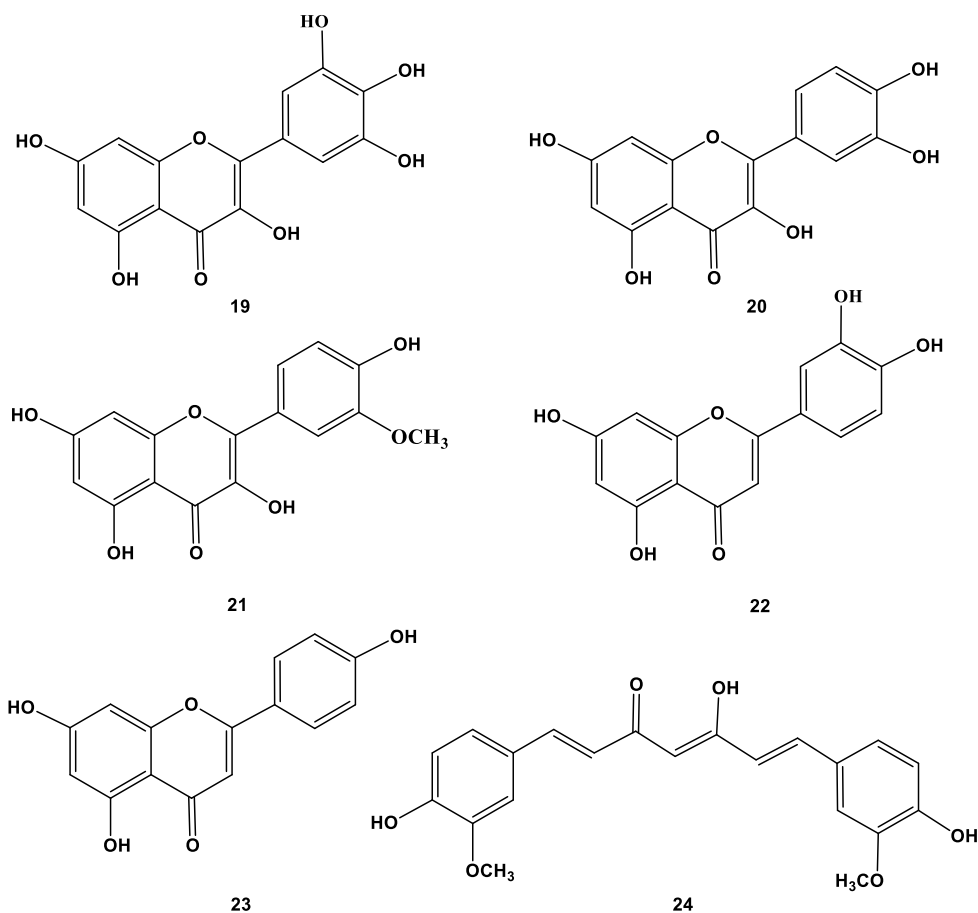




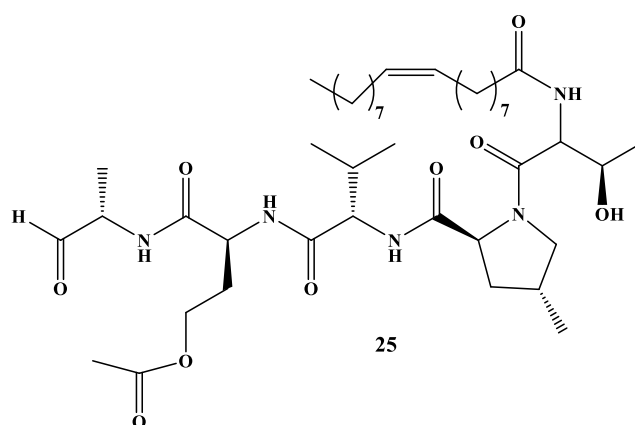
Os compostos que apresentaram excelentes propriedades de ancoragem para a RNA polimerase dependente de RNA NS5 do ZIKV foram os fenólicos 4',7-digaloilcatequina (**16**), di-*O*-dimetilsoguaiacina (**17**) e 2,4,4'-triidroxí-3,3'-diprenilchalcona (**18**), além do alcaloide flinderol B (**2**) (BYLER et al., 2016).



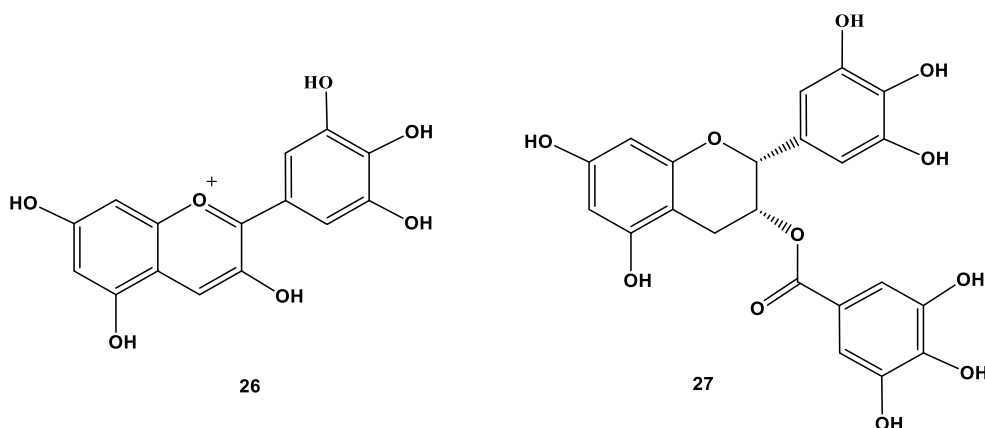
Em outro estudo *in silico* de Roy e colaboradores (2017), seis constituintes de legumes e frutas foram identificados como inibidores alostéricos não competitivos da protease NS2B-NS3pro do ZIKV, a saber os flavonoides miricetina (**19**), quercetina (**20**), isoramnetina (**21**), luteolina (**22**), e apigenina (**23**), além da curcumina (**24**).



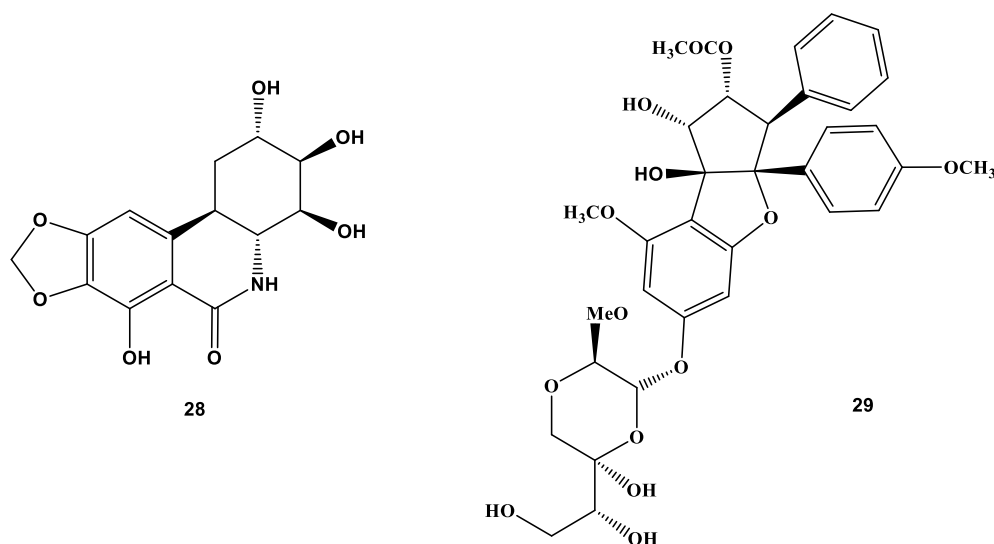
A cavinafungina (**25**) é um lipopeptídeo isolado do fungo *Colispora cavincula*. Em ensaios *in vitro*, essa substância foi identificada como um inibidor potente da multiplicação do ZIKV e de todos os quatro sorotipos do DENV [DENV-1(MY97-10245), DENV-2(MY97-10340), DENV- 3(MY05-34640), e DENV-4(MY01-22713)], além de ser um inibidor seletivo da SPase (complexo de serina-protease), que fica ligada à membrana celular, sendo responsável pela clivagem de proteínas recém-sintetizadas no retículo endoplasmático. A substância foi ativa frente ao ZIKV na concentração de 150 mM, atuando como inibidor seletivo de sinalizador de peptidase viral (ESTOPPEY et al., 2017).



Os polifenóis delphinidina (**26**) e galato de epigallocatequina (**27**), presentes em diversas espécies vegetais e consumidos em vinhos e chás, inibiram a replicação do ZIKV e do vírus da Dengue em cultura de células Vero (ATCC CCL-81), além de apresentarem ação virucida frente ao vírus do Nilo Ocidental, na concentração de 10 nM (VÁZQUEZ-CALVO et al., 2017). A inibição da replicação de ambos os vírus ocorreu provavelmente devido as semelhanças estruturais das suas partículas virais. Essa relação pode ser útil para estudos de triagem, onde uma mesma substância pode ser avaliada simultaneamente frente aos vírus da Zika e Dengue.

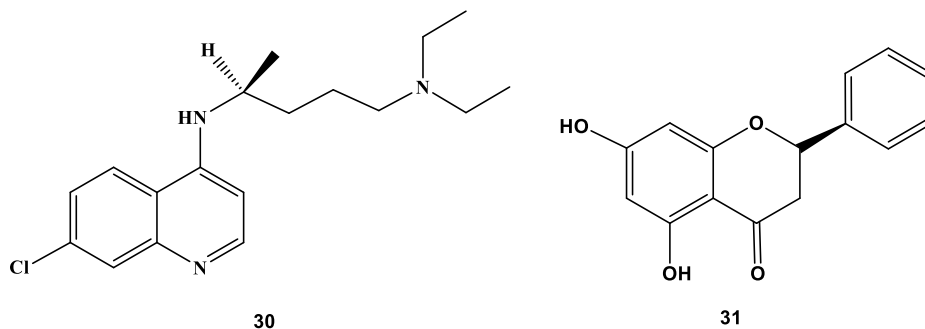


O alcaloide (+)-*trans*-diidronarciclasina (**28**), constituinte de espécies da família Amaryllidaceae, foi sintetizado por Revu e colaboradores (2016) e apresentou potente atividade contra o ZIKV em cultura de células Vero, com $CI_{50} < 3 - 15 \mu\text{g/mL}$.



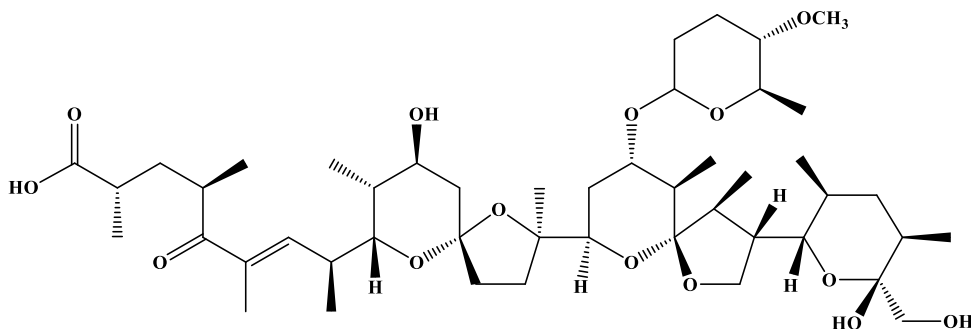
O silvestrol (**29**), isolado de *Aglaia foveolata*, inibiu significativamente a replicação do ZIKV, tanto em amostras de células A549 infectadas, nas concentrações de 5 e 50 nM, como em hepatócitos humanos primários, nas concentrações de 5, 10 e 100 nM (ELGNER et al., 2018). Os autores sugeriram o bloqueio da tradução do genoma viral como possível mecanismo de ação do silvestrol.

A cloroquina (**30**), fármaco usado no tratamento da malária, inibiu significativamente a infecção por ZIKV *in vitro* na concentração de 2,72 μM , bloqueando a internalização do vírus. Já em estudo *in vivo*, ela atenuou a morbimortalidade associada ao ZIKV em camundongos, na dose de 20 mg/kg/dia, tendo sido sugerido que o mecanismo de ação seja o bloqueio da adsorção viral (LI et al., 2017b).



A pinocembrina (**31**) é uma flavanona encontrada em plantas dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, e está presente no mel, chá e vinho tinto. Em uma triagem *in vitro* realizada com 483 flavonoides, a pinocembrina inibiu significativamente a multiplicação do ZIKV em células JEG-3 placentárias humanas ($\text{CI}_{50} = 17,4 \mu\text{M}$, $\text{CC}_{50} = 251 \mu\text{M}$). Neste estudo, os autores sugeriram que o mecanismo de ação da pinocembrina se dá pela inibição da produção do RNA viral e síntese de proteínas do envelope (LEE et al., 2019).

A nanchangmicina (**32**), um poliéter produzido pela bactéria *Streptomyces nanchangensis*, foi identificada como um potente inibidor da entrada do ZIKV (via endocitose mediada por clatrina) em diferentes tipos celulares, incluindo células Vero, U2OS (células de osteosarcoma humano, CI_{50} de 0,1 μM), HBMEC (células endoteliais microvasculares humanas, CI_{50} de 0,4 μM), células JEG-3 (trofoblastos humanos, CI_{50} de 0,97 μM) e células primárias [células endoteliais microvasculares do útero de humano (UtMEC), fibroblastos primários de placenta, e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC)] (RAUSCH et al., 2017). Nas linhagens de células para as quais não foram determinados os valores de CI_{50} , foram demonstradas reduções significativas da carga viral por imagens de microscopia confocal. A nanchangmicina também foi ativa contra o vírus do Nilo Ocidental, Dengue e Chikungunya, que usam uma rota de entrada na célula semelhante à do ZIKV (RAUSCH et al., 2017).

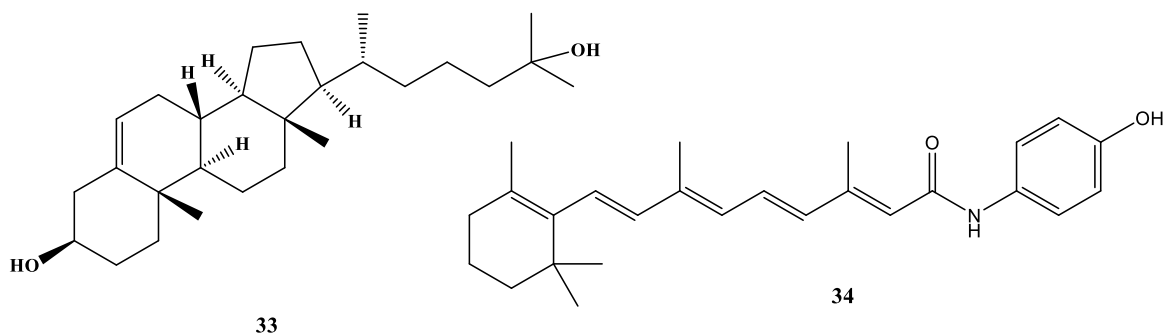


32

Extratos hexânico, em acetato de etila e metanólico das folhas, bem como extratos hexânico, clorofórmico e em acetato de etila dos galhos de *Tontelea micranta* não foram citotóxicos, apresentando valores de CC₅₀ superiores a 100 µg/mL em células Vero. Todos os extratos apresentaram atividade anti-ZIKV com valores de CI₅₀ entre 38,53 a 83,05 µg/mL. Os extratos hexânicos das folhas e galhos de *T. micranta* apresentaram efeito virucida. Além disso, os extratos em acetato de etila (índice de seletividade IS = 3,03) e metanólico (IS = 4,23) foram mais efetivos/ativos nas concentrações de 31,2 e 15,6 µg/mL nas etapas de adsorção e penetração viral, respectivamente (FERREIRA, et al., 2019).

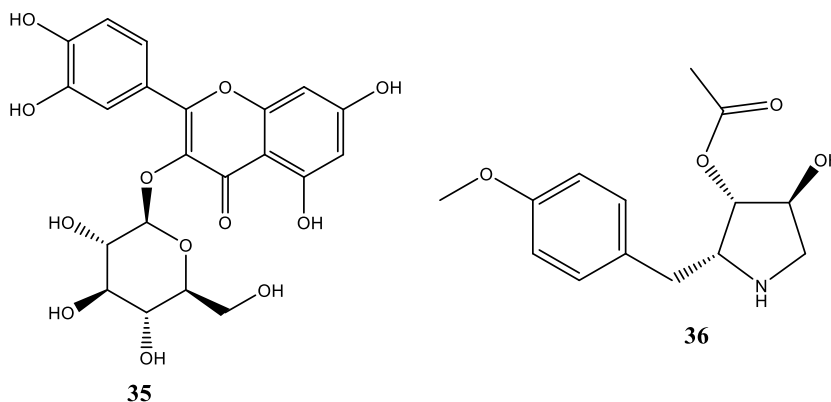
O extrato etanólico dos frutos de *Schinus terebinthifolius* apresentou atividade anti-ZIKV, na concentração de 100 µg/mL, com redução da carga viral determinada por RT-PCRq e citometria de fluxo, mas o extrato das cascas da mesma espécie foi inativo (OLIVEIRA et al., 2020).

O 25-hidroxicolesterol (25HC) (**33**) é um esteroide natural que controla a biossíntese de esteróis e está envolvido na resposta imune inata. A administração do 25HC (50 mg/kg) em camundongos prenhes reduziu a infecção pelo ZIKV no cérebro fetal e protegeu contra a microcefalia induzida pelo ZIKV, sem relato de ocorrência de efeitos adversos na gravidez relacionados à administração do esteroide. Ainda como resultado do mesmo estudo, os pesquisadores estabeleceram que o 25HC (1,5 mg/kg/dia, intravenosa) é protetor e reduziu a viremia em modelos animais (ratos e macacos) frente à infecção pelo ZIKV. Camundongos tratados com 25HC foram mais propensos a sobreviver à infecção pelo vírus, e os camundongos sobreviventes não apresentavam sintomas clínicos. Os macacos que receberam 25HC também tiveram níveis reduzidos de ZIKV no sangue e na urina, e não desenvolveram febre em resposta à infecção. O 25HC (0,5 mM) suprimiu a infecção e reduziu o dano tecidual em organoides corticais humanos (teste *in vitro*). Em estudos com células Vero, sugeriu-se como mecanismo de ação do 25-hidroxicolesterol, o bloqueio da entrada do vírus na célula (LI et al., 2017a).



A administração de N-(4-hidroxifenil) retinamida (**34**) em camundongos (60 mg/kg, 2 vezes ao dia, intraperitoneal) reduziu significativamente a viremia sérica, carga viral cerebral de ZIKV e síntese de RNA viral, sem promover inibição direta da polimerase viral ou desestabilização química dos complexos de replicação associados à membrana. Além disso, (**34**) inibiu o ZIKV (linhagem africana e asiática) em células Vero, na concentração de 20 μ M (PITTS et al., 2017).

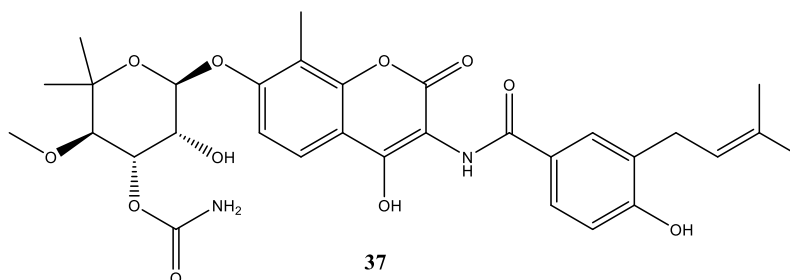
O tratamento com quercetina-3- β -O-D-glicosídeo (**35**) (50 mg/kg, 1 vez ao dia, intraperitoneal) promoveu a sobrevivência de 50% dos animais infectados, com perda de peso média de ~ 20% (WONG et al., 2017).



A eficácia anti-ZIKV do alcaloide anisomicina (**36**) (isolado da bactéria *Streptomyces* spp.) foi avaliada *in vivo* e mostrou que os animais tratados com anisomicina em dose baixa (4 mg/kg, 1 vez ao dia, subcutâneo) apresentaram redução significativa da viremia e sobrevida superior ao grupo controle. No entanto, esse efeito protetor foi perdido em doses mais altas (100 mg/kg, 1 vez ao dia, subcutânea) (QUINTANA et al., 2020).

A novobiocina (**37**) é um antibiótico aminocumarínico produzido pelo actinomiceto *Streptomyces niveus*, uma bactéria Gram-positiva. O tratamento de camundongos com novobiocina (100 mg/kg, 2 vezes ao dia, subcutâneo) aumentou a taxa de sobrevivência significativamente, reduziu a carga viral média (≥ 2 log de redução) no sangue e tecidos,

juntamente com alterações histopatológicas menos graves em comparação com os animais não tratados (YUAN et al., 2017b).



A atividade anti-ZIKV do peptídeo AH-D (derivado dos primeiros 27 aminoácidos da proteína não estrutural NS5A do vírus da hepatite C) também foi demonstrada em estudos *in vivo*. O tratamento de camundongos IFN α / β R $^{-/-}$ (A129) com AH-D (25mg/kg, 2 vezes ao dia, intraperitoneal) reduziu a carga viral (3-log) e a inflamação cerebral, e também promoveu a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (JACKMAN et al., 2018).

Em síntese, aqui estão descritos alguns produtos naturais investigados em estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, frente ao ZIKV. Existe um maior número de estudos relatando avaliações *in silico* e *in vitro*, enquanto aqueles baseados em ensaios *in vivo* são escassos. Em resumo, na Figura 10, estão apresentados os artigos publicados entre 1997 e maio de 2022 referentes a produtos naturais ativos frente ao ZIKV.

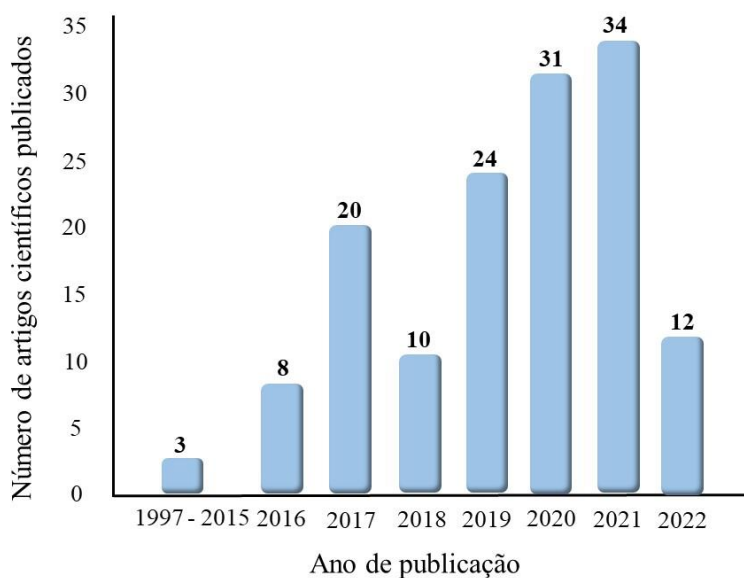


Figura 10. Artigos relacionados à atividade de produtos naturais contra o *Zika virus*, publicados entre 1997 e maio de 2022. Fonte: própria.

Portanto, no presente trabalho foi destacado a relevância da triagem e da busca de constituintes candidatos promissores a agentes anti-ZIKV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solventes e reagentes

- Acetato de etila grau P.A., Neon.
- Acetona grau P.A., Neon.
- Acetonitrila grau CLAE, Loba Chemie.
- Ácido acético glacial grau P.A., Neon.
- Ácido fórmico grau CLAE, Sigma-Aldrich.
- Ácido sulfúrico grau P.A., Isofar.
- Álcool etílico 96 °Gl, Santa Cruz.
- Anisaldeído grau P.A., Vetec.
- Antibióticos: penicilina, estreptomicina, gentamicina, Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sódio P.A., Neon.
- Carboximetilcelulose sal sódico, Synth.
- Cristal violeta, Synth.
- Diclorometano grau P.A., Neon.
- DMSO grau para análise (P.A.), Synth
- Éter etílico grau P.A., Vetec.
- Hexano grau P.A., Neon.
- Kit de LDH, Bioclin.
- Meio de cultura DMEM/F-12, Gibco.
- Meio de cultura RPMI 1640, Cultilab.
- Metanol grau CLAE, Loba Chemie.
- Metanol grau P.A., Neon.
- MTT, Sigma-Aldrich.
- Nitrogênio líquido, White Martins.
- PBS (solução salina tamponada de fosfato), Synth.
- Silica flash, 250-400 mesh, Sigma-Aldrich.
- Sílica gel para CCD, Macherey-Nagel.
- Soro fetal bovino estéril, Cultilab.
- Suplementos para meios de cultura: aminoácidos não essenciais, piruvato de sódio, L-glutamina, Sigma-Aldrich.
- Tripsina-EDTA, Cultilab.

- Triton X-100, Synth.

4.2 Materiais diversos

- Béqueres, erlenmeyers e provetas de diferentes tamanhos, Satelit.
- Borrifador de vidro.
- Câmara de Neubauer, Labor Optik.
- Cápsula de evaporação em porcelana, Chiarotti.
- Coluna analítica para CLUE Acquity UPLC HSS, C-18, com partículas de 1,8 μm , 50 \times 2,1 mm d.i., Waters.
- Coluna cromatográfica de vidro de dimensões variadas.
- Cromatoplasca analítica de sílica gel 60 F254, folhas de alumínio (20 \times 20 cm), Merck.
- Cromatoplasca de vidro de 5 \times 10 cm e 10 \times 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro, Pyrex.
- Filtro de membrana 0,22 μm , estéril, Biofil.
- Filtro de seringa PTFE (Politetrafluoretileno).
- Funil de Buchner, Chiarotti.
- Garrafas pequenas (25 cm^2), médias (75 cm^2) e grandes (e 175 cm^2) para cultivo celular, Sarstedt TC.
- Lamínulas para câmara de Neubauer.
- Micropipeta multicanal de 20 - 200 μL , Labmate soft.
- Micropipetas monocal de 1 - 10 μL , 20 - 200 μL e 100 -1000 μL , Labmate soft.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, KASVI.
- Pipeta de Pasteur de vidro.
- Pipetador automático, K1-AID-B, KASVI.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 10 mL, KASVI.
- Placa de toque em porcelana, Chiarotti.
- Placas 12 e 24 poços para cultivo celular, KASVI.
- Ponteiras plásticas, Axygen.
- Seringa de 1 mL, Labor import.
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, para membrana de 0,22 μm , capacidade para 500 mL e 1000 mL, Biofil.
- Suporte para tubos de fundo cônico.

- Tubo criogênico de 1 mL, IMEC.
- Tubos plásticos do de fundo cônico com volumes de 15 e 50 mL, Falcon.
- Tubos plásticos do tipo *safe-lock* de 0,5, 1,5 e 2 mL, Jet Biofilm.
- Vials de vidro de borossilicato com tampa de polipropileno e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de CLAE e CLUE-EM.

4.3 Equipamentos

- Balança analítica, Denver instrument, RS 232.
- Balança analítica, Mettler Toledo, modelo AB 204.
- Balança analítica, Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança de precisão, Nucleo equipamentos, NC 1060.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de água, Büchi, B-480.
- Banho de ultrassom, UNIQUE, USC 1400.
- Banho ultratermostático, Nova Técnica.
- Banho-maria Dellta, modelo 210DI.
- Bomba de vácuo, Büchi, V700.
- Cabine de segurança biológica Veco, modelo Bio Seg 12.
- Centrífuga Hettich Universal 320 e 320R.
- Centrífuga para Microtubos, Quimis, Q222E.
- Controlador de vácuo, Büchi, V850.
- Cromatógrafo GCMS-QP2010 ULTRA (Shimadzu), dotado de bibliotecas espectrais NIST-14 e NIST-27 (*Special Database*), FFNSC (*Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*) e Wiley library do programa LabSolution/CGMS Solution, versão 4.20.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrômetro de RMN Bruker, modelo Ascend™ 600 MHz.
- Estufa de CO₂ Thermo Scientific, series II Water Jacket.
- Estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), Tecnal, TE-371.
- Estufa para secagem, FANEM, 515.
- *Freezer* -80 °C, Termo Scientific, series 88000.
- Lanterna de emissão de radiação ultravioleta, Boitton (365 nm UVA e 254 nm UVC).

- Leitor de microplacas, Spectra max Plus.
- Micro-ondas doméstico, ELETROLUX MT030.
- Microscópio invertido modelo TCM 400, Labomed.
- Moinho de facas, Solab, SL-30.
- Phmetro, HL1110, Hanna instruments
- Purificador de água Milli-Q Plus – Direct-Q 3 Millipore.
- Refrigerador.
- Rotaevaporador, Büchi, R-114.
- Soprador térmico serigráfico Skil, modelo 8003, 1800W.
- Waters Acquity UPLC system (Waters, USA), composto de bomba binária, amostrador automático, linha de desgaseificador, equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD), acoplado a detector Xeco Triplo Quadrupole MS (Waters) equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) e sistema computadorizado operado pelo programa MassLynx.

4.4 Eluentes para CCD

Os eluentes foram preparados utilizando os solventes *n*-hexano, acetato de etila, diclorometano, metanol e éter etílico em proporções variadas (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1). A solução foi homogeneizada e transferida para uma cuba cromatográfica de vidro para CCD.

4.5 Revelador para CCD

Reagente anisaldeído-ácido sulfúrico (WAGNER e BLADT, 1996)

A solução foi preparada pela mistura de 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico, nesta ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento do uso, à 20 °C.

4.6 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatoplasmas foram preparadas sobre uma placa de vidro, utilizando suspensão de sílica gel Merck 60 G em água [8 g para 18 mL (m/v)], camada de 0,25 mm de espessura. Após secas à temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa à 100 °C por 120 minutos. As placas foram inicialmente analisadas sob luz ultravioleta e depois reveladas com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento em estufa à 100 °C. Também foram utilizadas cromatoplasmas

analítica de sílica gel 60 (folhas de alumínio) para avaliar perfil cromatográfico das substâncias isoladas.

4.7 Ponto de fusão (PF)

A determinação do ponto de fusão foi realizada em equipamento MQAPF-301 da Microquímica. Sólidos com faixa de início e fim da fusão, inferior a 3 °C foram considerados puros.

4.8 Seleção de espécies para estudo

Para seleção das espécies vegetais para estudo foi realizado um levantamento bibliográfico, utilizando uma abordagem quimiosistemática, de espécies cujos extratos estão disponíveis na extratoteca do Laboratório de Fitoquímica, buscando-se identificar aquelas que produzem polifenóis, triterpenos e esteroides. O levantamento da composição química das espécies foi realizado através da busca em bancos de dados (Pubmed, Scopus, SciFinder e outros). Desta forma, foram identificadas como candidatas para estudo as espécies elencadas na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies vegetais selecionadas para estudo.

Família	Espécies	Número de Exsicata	Parte utilizada	Número do extrato
Alismataceae	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli	BHCB107791	Folhas	1
			Caules	2
Apocynaceae	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	BHCB165298	Folhas	3
			Folhas	4
Asteraceae	<i>Baccharis altimontana</i> G. Heiden et al.	ECT5981	Partes aéreas	5
			Folhas	6
	<i>Baccharis calvescens</i> DC.	ECT5549	Folhas	7
			Caules	8

Tabela 1. Continuação

	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	RB777684	Folhas	9
	<i>Baccharis hemiptera</i> G. Heiden & A.A.Schneid	ECT5982	Partes aéreas	10
	<i>Baccharis imbricata</i> Malag.	ECT5912	Folhas	11
	<i>Baccharis intermixta</i> Gardner	ECT0355	Folhas	12
	<i>Baccharis magnifica</i> G. Heiden, Leoni & J.N.Nakaj.	ECT5983	Caules	13
	<i>Baccharis myriocephala</i> DC.	ECT6257	Partes aéreas	14
	<i>Baccharis opuntioides</i> Mart. ex Baker	ECT5987	Partes aéreas	15
	<i>Baccharis parvidentata</i> Malag.	ECT5984	Folhas	16
	<i>Baccharis platypoda</i> DC.	ECT5974	Folhas	17
	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	ECT6262	Folhas	18
	<i>Baccharis retusa</i> DC.	ECT6260	Folhas	19
	<i>Baccharis serrulata</i> (Lam.) Pers.	ECT6213	Partes aéreas	20
	<i>Symphyopappus brasiliensis</i> (Gardner) R.M.King & H.Rob.	ECT5975	Folhas	21
	<i>Symphyopappus</i> <i>lymansmithii</i> B.L.Rob.	ECT 5970	Folhas	22
	<i>Maytenus acanthophylla</i> (Reissek) Biral	HUESB7813	Folhas	23
Celastraceae			Folhas	24

Tabela 1. Continuação

	<i>Maytenus ilicifolia</i> (Mart. ex Reissek) Biral	FUEL21881	Folhas	25
			Folhas	26
	<i>Maytenus rigida</i> (Mart.) Biral	HUESB7056	Raízes	27
	<i>Maytenus truncata</i> (Nees) Biral	HUESB9311	Folhas	28
Combretaceae	<i>Terminalia phaeocarpa</i> Eichler	BHCB201083	Folhas	29
	<i>Terminalia glabrescens</i> Mart.	BHCB201961	Folhas	30
Erythroxyloaceae	<i>Erythroxyllum deciduum</i> A. St.-Hil	BHCB115735	Folhas	31
	<i>Erythroxyllum tortuosum</i> Mart.	BHCB111065	Folhas	32
Malvaceae	<i>Sida glaziovii</i> K. Schum.	PAMG45844	Folhas	33
Ochnaceae			Caules	34
	<i>Ouratea castaneifolia</i> DC.	BHCB50394	Folhas	35
	<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart.) Engl.	BHCB48940	Caules	36
			Folhas	37

Os extratos de *Baccharis* foram preparados por maceração e os outros extratos foram preparados por percolação todos com EtOH 96 °GL, exceto 3 (percolação com acetona / água 7:3), 4 (percolação com EtOAc/MeOH 1:1), 23 (decoção com água), 25 (percolação com DCM) e 26 (percolação com MeOH). BHCB = Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais; ECT = Herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Clima Temperado, Rio Grande do Sul; FUEL = Herbário da Universidade Federal de Londrina, Brazil; HUESB = Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Brazil; PAMG = Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Brazil; RB = Herbário da Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brazil.

4.9 Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

As espécies de *Baccharis* foram coletadas pelo professor Dr. Geraldo Wilson Fernandes, do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

da UFMG e identificadas pelo pesquisador Dr. Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado, Pelotas (ECT). As exsiccatas foram depositadas no Herbário ECT. Os locais de coletas selecionados foram o Parque Nacional de Caparaó (ES/MG) e a Serra da Calçada (MG). As folhas de *Hancornia speciosa* foram adquiridas secas e rasuradas do Laboratório Catedral. O material vegetal de *Ouratea spectabilis* foi coletado no município de Perdizes em Minas Gerais e a espécie identificada por botânicos do Departamento de Botânica, ICB, UFMG. Os materiais vegetais de *Maytenus acanthophylla*, *Maytenus truncata* e *Maytenus rigida* foram coletadas na zona rural do município de Jequié, Bahia. Os números das exsiccatas estão listados na Tabela 1 (item 4.8).

Conforme mencionado, foram utilizados para esse estudo extratos disponíveis na extratoteca do Laboratório de Fitoquímica. As drogas vegetais secas e pulverizadas foram submetidas à extração com etanol 96° GL e para algumas delas também foram preparados extratos em acetona / água (70:30), acetato de etila / metanol (1:1), diclorometano, metanol e água, conforme descrito no rodapé da Tabela 1 (item 4.8). O solvente foi, então, evaporado por meio de evaporador rotatório para obtenção do extrato bruto. No caso da extração aquosa, a água foi removida por liofilização. Os extratos brutos foram mantidos em dessecador, sob vácuo, para eliminação do solvente residual.

Os extratos de *Maytenus acanthophylla*, *Maytenus truncata* e *Maytenus rigida*, bem como as substâncias lupeol, ducitol e uma mistura de triterpenos foram cedidas gentilmente pelo professor Dr. Djalma Menezes de Oliveira da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Esses extratos foram preparados conforme descrito acima.

Na Tabela 1 (item 4.8) estão listadas as informações dos 37 extratos selecionados. Além dos extratos brutos, foram selecionadas para estudo oito substâncias isoladas (estruturas químicas vide item 5.2) de algumas das espécies selecionadas para triagem e uma mistura de triterpenos pentacíclicos (Tabela 2).

Tabela 2. Produtos naturais selecionados para estudo.

Nome	Espécie a partir do qual foi isolado	Código
Mansoina A	<i>Mansoa hirsuta</i> DC.	C1
Ourateina D	<i>Ouratea spectabilis</i> (Mart.) Engl.	C2
Diidroisocumarina	<i>Xyris pterygoblephara</i> Steud	C3
Ácido <i>trans</i> -aconítico	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli	C4

Tabela 2. Continuação

Ácido <i>cis</i> -aconítico	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham. & Schltld.) Micheli	C5
Lupeol	<i>Maytenus acanthophylla</i> (Reissek) Biral	C6
Dulcitol	<i>Maytenus acanthophylla</i> (Reissek) Biral	C7
L-(+)-Bornesitol	<i>Hancornia speciosa</i> Gomes	C8
Friedelina+Friedelinol	<i>Maytenus acanthophylla</i> (Reissek) Biral	M1

4.10 Ensaios biológicos

4.10.1 Linhagens celulares e vírus

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados no Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, coordenado pelo Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira. Os ensaios foram realizados sob supervisão da Prof^a. Dra. Vivian Vasconcelos Costa. Nesses ensaios foram utilizadas as linhagens celulares e os vírus descritos a seguir.

- Células Vero CCL-81: células de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops* da American Type Culture Collection (ATCC CCL-81) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ-0245). Essas células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos, mantidas em estufa à 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.
- Células SH-SY5Y (ATCC CRL-2266): células do epitélio neural de neuroblastoma humano, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ-0023). Essas células foram cultivadas em meio DMEM/F-12 com suplementação de aminoácidos não essenciais (1%), piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM), suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa à 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂.
- *Zika virus*: foi utilizado o isolado clínico do ZIKV (HS-2015-BA-01; disponível em: ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX520666) obtido do soro de paciente infectado durante o surto da infecção em 2015 na cidade de Salvador/BA, o qual foi gentilmente cedido pela Prof^a. Sílvia Sardi da Universidade Federal da Bahia (UFBA). O vírus foi propagado em células de *Aedes albopictus* C6/36, obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ 0343) e mantidas em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) à 28

°C, na presença de meio L-15 suplementado com 2% de SFB e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, à 37 °C e 5% CO₂ por 7 dias (COSTA et al., 2017). O sobrenadante obtido das culturas infectadas foi centrifugado à 644 g por 10 min para retirada dos debrís celulares.

4.10.2 Cultivo celular

As células foram cultivadas em garrafas estéreis com seu respectivo meio de cultura contendo antibióticos e suplementação, conforme descrito no item 4.10.1 para cada linhagem celular, e mantidas em estufa à 37 °C. Os repiques foram realizados utilizando solução de tripsina-EDTA por 3 a 5 min, na proporção de 1:3, para desprender as células aderidas. Para armazenamento das linhagens, as células (10⁶ células/mL) foram suspensas em meio de cultura e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente à -80 °C durante 48 horas, e então transferidas para armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C).

Para realizar os ensaios em células Vero CCL-81, estas foram descongeladas à 37 °C e adicionadas em garrafas pequenas (50 mL) contendo meio de cultura adequado, como descrito anteriormente. Após adesão das células à superfície da garrafa (~24 horas), o meio foi substituído, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido.

Para a realizar os ensaios em células SH-SY5Y, estas foram descongeladas à 37 °C, centrifugadas para retirada dos debrís celulares, e adicionadas em garrafas pequenas contendo meio de cultura específico supracitado. Após adesão das células à superfície da garrafa (~48 horas), o meio foi substituído, eliminando os resquícios do meio de congelamento (DMSO) e eventuais células mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido.

4.10.3 Determinação do título viral

As células Vero CCL-81 foram cultivadas em placas de 24 poços (5×10⁵ células/poço) e, após formação da monocamada com 90% de confluência, foi adicionada aos poços uma alíquota de 300 µL de diluições seriadas do ZIKV, obtidas em RPMI sem suplementação com SFB, deixando um poço como controle de células, no qual foram adicionados 300 µL de RPMI sem SFB. As placas foram incubadas em estufa por 1 h, à 37 °C, em 5% CO₂, com homogeneização constante, para adsorção viral. Na sequência, o meio foi removido e a cada poço foi adicionado 1 mL de meio RPMI contendo 1,6% de carboximetilcelulose (CMC), seguindo-se nova incubação nas condições anteriormente descritas. Após 4 dias, o meio foi

removido e as células foram fixadas com solução de formol a 10% por 2 horas. Após o descarte e lavagem do formol, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta (10% formol tamponado e 1% cristal violeta). O título viral foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP) observadas nos poços, cujas diluições apresentaram entre 10 e 100 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL, utilizando a seguinte equação (1):

$$\text{Título viral (UFP/mL)} = N \times FC \times 10^*$$

Onde N= número de placas de lise contadas; FC= fator de correção por mL (3,3); *= inverso da diluição no qual foram contadas as placas de lise. O volume de sobrenadante (VS) foi de 0,3 mL.

O esquema experimental adotado está representado na Figura 11.

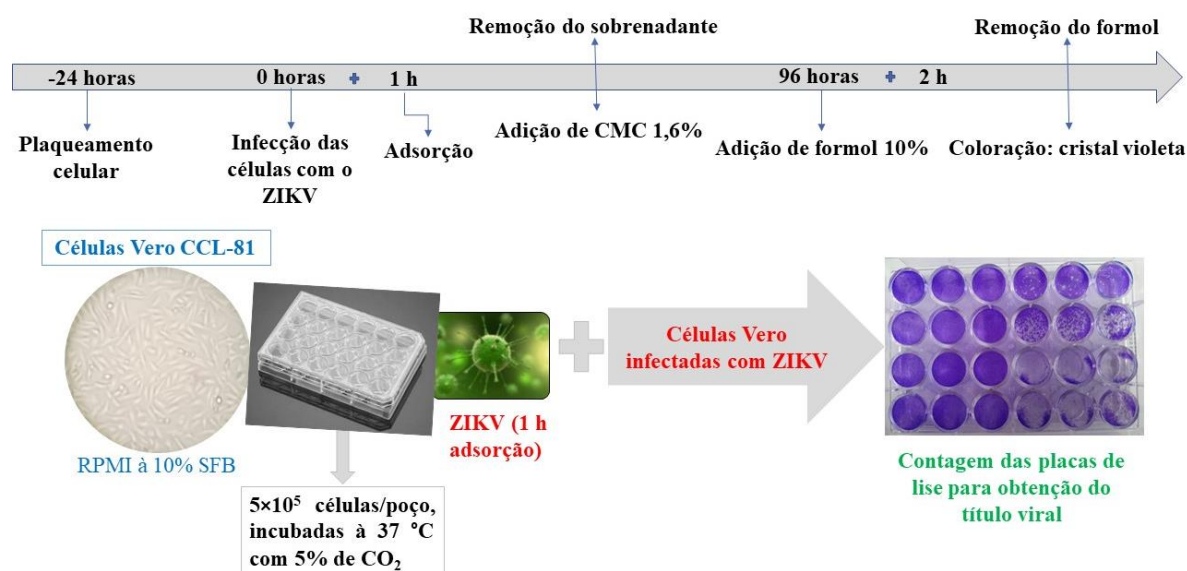


Figura 11. Esquema do ensaio para determinação do título viral.

4.10.4 Preparo das soluções das amostras para ensaio

Uma porção de 2,0 mg de cada extrato e da mistura de triterpenos foi pesada e diluída em 100 µL de DMSO (solução estoque, 20 mg/mL). As substâncias selecionadas foram diluídas em DMSO para a concentração de 500 µM (solução estoque). A solução estoque foi armazenada à -20 °C e utilizada no preparo das soluções de trabalho no dia do ensaio. Para a realização dos experimentos, a solução estoque foi diluída com meio de cultura RPMI. A concentração do DMSO nas soluções de trabalho preparadas com meio RPMI foi mantida em, no máximo, 0,3 % v/v.

Com base nos resultados dos ensaios *in vitro* e na disponibilidade de massa, os extratos com atividade anti-ZIKV frente as duas linhagens celulares (Vero CCL-81 e SH-SY5Y),

tiveram suas frações e compostos isolados testados. O preparo da solução estoque seguiu o mesmo procedimento realizado para os extratos e as substâncias selecionadas.

4.10.5 Ensaio para avaliação da citotoxicidade e determinação da CC₅₀

A citotoxicidade das amostras selecionadas para estudo foi inicialmente avaliada em células Vero CCL-81 nas concentrações de 10, 30 e 90,0 µg/mL para os extratos e 1, 10 e 30,0 µM para as substâncias selecionadas. Os métodos empregados foram o do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio] descrito por Mosmann (1983), com adaptações, e do LDH (lactato-desidrogenase) (DECKER e LOHMANN-MATTHES, 1988). O ensaio do LDH foi padronizado no laboratório utilizando o Kit LDH (https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUCOES_LACTATO.pdf). Como controle positivo para o teste LDH foi utilizado o Triton, um agente surfactante aniônico capaz de lisar a membrana celular. Para o MTT foi utilizado o solvente DMSO como controle negativo, utilizado para diluir as amostras.

Células Vero CCL-81 foram plaqueadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1×10^5 células/poço, e incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. Para a realização deste experimento foram utilizados os seguintes controles: controle de células somente com meio, controle de células com meio e o diluente das amostras (DMSO a 0,3% em RPMI), e controle de células com meio e amostras ensaiadas. Após o período de incubação, o meio foi removido e adicionaram-se 100 µL de meio RPMI sem SFB a cada poço e a placa foi centrifugada por 2 min à 232 g. O sobrenadante foi removido e o procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL das soluções das amostras (10, 30 e 90 µg/mL) e adicionaram-se mais 100 µL de meio RPMI. As placas foram então incubadas à 37°C com 5% de CO₂, por 48 horas. Após este período, foi avaliada a viabilidade das células pelos ensaios de MTT e LDH. Para realização do teste de LDH foi retirada uma alíquota de 4 µL do sobrenadante de cada poço, a qual foi transferida para uma placa de 96 poços e então adicionado o reagente LDH (reagente 1: substrato tamponado e reagente 2: coenzima, na proporção 1:5). Foram realizadas quatro leituras da absorbância no comprimento de onda de 340 nm em leitor de microplacas (1ª leitura imediatamente após a adição do reagente LDH e leituras sequenciais nos tempos de 1, 3 e 4 minutos). A viabilidade celular foi calculada por meio da equação (2):

$$\Delta/\text{min} = [(\text{Abs. } 1^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{Abs. } 2^{\text{a}} \text{ leitura}) + (\text{Abs. } 3^{\text{a}} \text{ leitura} - \text{Abs. } 4^{\text{a}} \text{ leitura})]/2 \times 20794,34.$$

Onde o valor de 20794,34 representa o fator de correção. Esta equação (2) foi elaborada com base nas informações do Kit LDH.

Para realização do ensaio de MTT foram descartados, da mesma placa de 96 poços, 106 μL de sobrenadante, restando 90 μL em cada poço. Na sequência, foram adicionados 10 μL de solução de MTT (5 mg/mL em 1 mL de PBS, concentração final de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por poço) a cada poço, e a placa foi incubada à 37 °C com 5% de CO_2 por 90 minutos. Após esse período, foram adicionados 100 μL de DMSO por poço e a placa foi mantida em agitação constante por 15 minutos à temperatura ambiente. Foi então realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 540 nm em leitor de microplacas. A partir dos valores de absorbância obtidos foi calculada a viabilidade celular utilizando a seguinte equação (3):

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

Onde A é o valor de absorbância das células tratadas e B corresponde à absorbância das células não tratadas.

A citotoxicidade das amostras também foi avaliada na linhagem SH-SY5Y. Nesta linhagem, as concentrações ensaiadas foram 3, 10 e 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os extratos e 10 e 30,0 μM para as substâncias isoladas. Em ambas as linhagens, os ensaios foram realizados utilizando células provenientes de três congelamentos distintos, constituindo triplicata biológica, e para cada congelamento foi realizada uma triplicata experimental. A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi determinada para os extratos e substâncias isoladas que apresentaram atividade antiviral (item 4.10.6.2).

A CC_{50} de um extrato foi definida pela concentração do extrato que reduziu em 50% a viabilidade celular quando comparada às células não tratadas (células controle). A concentração do DMSO nas soluções de trabalho foi mantida > 2 % v/v. Para determinar a CC_{50} dos extratos selecionados e substâncias isoladas, as linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos (480, 240, 120, 60, 30, 15, 7,5 e 3,725 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e das substâncias isoladas (300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 e 0,1 μM). Os valores de CC_{50} foram obtidos a partir da análise da regressão não-linear da curva de concentração-resposta, utilizando-se os valores de viabilidade celular para cada concentração, calculados pela equação (4) (FERRAZ et al., 2019):

$$\% \text{ viabilidade celular} = \text{células tratadas} / \text{células não tratadas} \times 100$$

Os valores de CC_{50} foram calculados com os valores da média da triplicata biológica e triplicata experimental. O esquema experimental adotado está representado na Figura 12.

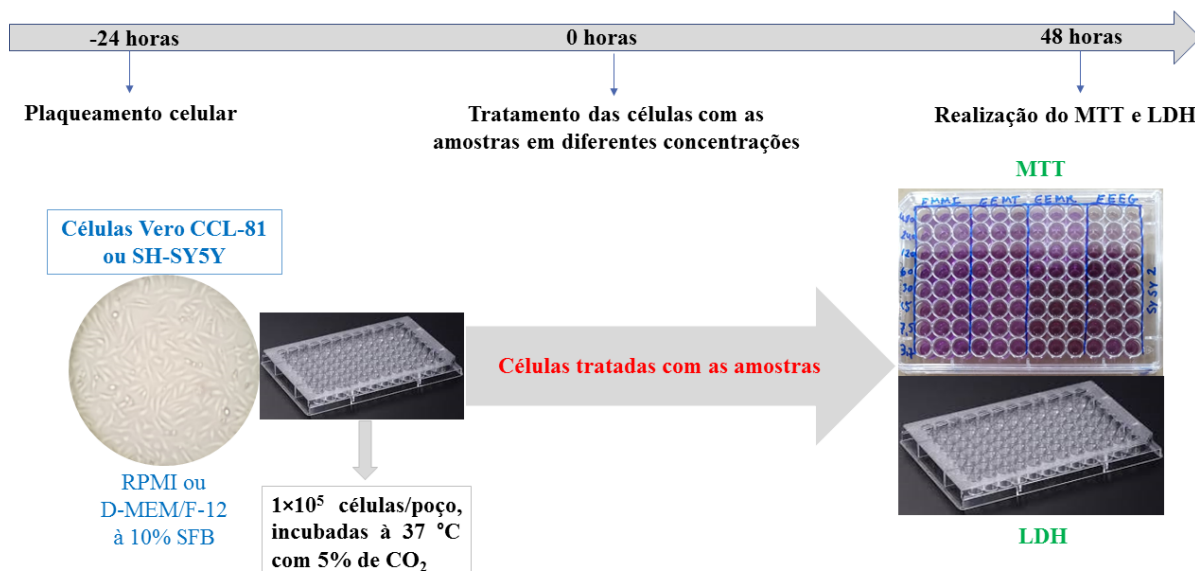


Figura 12. Esquema do ensaio para avaliação da citotoxicidade e determinação da CC_{50} .

A citotoxicidade de alguns extratos selecionados também foi avaliada pelo método da sulforodamina B, descrito por Vichai e Kirtikara (2006), com adaptações. Células Vero foram plaqueadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço, e incubadas à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, com 5% de CO_2 , por 24 horas. Para a realização deste experimento, foram utilizados os mesmos controles citados anteriormente. Após o período de incubação, as células foram tratadas com 100 μL das soluções amostra (10, 30 e 90,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e adicionaram-se mais 100 μL de meio RPMI. As placas foram então incubadas à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com 5% de CO_2 , por 24 horas. O meio foi removido e as células foram fixadas com 100 μL da solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% adicionado a cada poço. A placa foi mantida à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Em seguida, o sobrenadante dos poços foi descartado e as células foram lavadas 3 vezes com 200 μL de água destilada e os poços foram deixados secar por 24 horas. Acrescentaram-se, então, 100 μL da solução de SRB (0,057% m/v) a cada poço e a placa foi mantida em repouso, à temperatura ambiente por 30 minutos. Na sequência, o sobrenadante foi removido e as cavidades foram lavadas rapidamente com 200 μL de solução de ácido acético a 1%, por 4 vezes, para remover o excesso de corante presente nos poços da microplaca. Ao fim, a placa foi deixada em repouso para secagem, por 24 horas. Adicionaram-se, então, 100 μL da solução Tris Base 10 nM (pH 10,5) em todos os poços para extração do corante ligado às proteínas. Na sequência, a placa foi agitada por 5 min no leitor de microplacas e a leitura da absorbância foi realizada em 510 nm. A partir dos valores de absorbância obtidos foi calculada a viabilidade celular pelo método SRB utilizando a mesma equação descrita no método do MTT.

4.10.6 Ensaios antivirais

Todos os ensaios antivirais foram realizados em triplicata biológica e triplicata experimental. Os extratos, frações e substâncias selecionadas e isoladas foram avaliados em concentrações não citotóxicas, que resultaram em viabilidade celular acima de 80%. As soluções estoque das amostras foram preparadas em DMSO e as soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque em meio RPMI. Os controles usados foram DMSO a 0,3% (controle negativo) e AH-D (controle positivo usado na concentração de 100 µM). O AH-D é um peptídeo antiviral de massa molecular 3284,7 Da, obtido de uma proteína não estrutural de NS5A do vírus da hepatite C e que atua desestabilizando a membrana lipídica viral (CHO et al., 2009; JACKMAN et al., 2018). Sua atividade antiviral foi anteriormente demonstrada em ensaios *in vitro* e *in vivo* (JACKMAN et al., 2016; JACKMAN et al., 2018; CAMARGOS et al., 2019). Este peptídeo AH-D foi gentilmente cedido pelo Prof. Nanjoom Cho da Universidade Tecnológica de Nanyang, em Cingapura.

4.10.6.1 Padronização da MOI

Inicialmente foi necessário realizar a padronização da multiplicidade de infecção (MOI) do ZIKV. O ensaio de padronização da MOI do ZIKV segue o mesmo procedimento do ensaio de atividade antiviral (item 4.10.6.2), porém não existe grupo tratado (poços de veículo e poços de amostra). Para realização do ensaio de padronização da MOI foram utilizados os seguintes poços teste: poços contendo células somente com meio; e, poços contendo células infectadas com ZIKV em diferentes MOIs. A padronização foi realizada para o tempo de 48 h, com base em resultados anteriores do grupo de pesquisa. A padronização da MOI do ZIKV foi realizada em células Vero CCL-81 e SH-SY5Y, para tanto, o resultado dessa padronização está descrito no item 5.3.1.

4.10.6.2 Ensaio para detecção da atividade antiviral, determinação da CE₅₀ e IS

Para a realização dos experimentos de atividade antiviral, foram utilizados os seguintes poços teste: poços contendo células somente com meio; poços contendo células infectadas com ZIKV (MOI de 1); poços contendo células infectadas com ZIKV e tratadas com o veículo das amostras (DMSO 0,3%); e poços contendo células tratadas com as soluções dos extratos, frações e/ou substâncias isoladas e infectados com o ZIKV na MOI de 1.

Células Vero CCL-81 foram plaqueadas em placas de 96 poços, na densidade de 1×10^5 células/poço, e incubadas à 37 °C com 5% de CO₂, por 24 horas. O meio foi removido e

imediatamente as células foram infectadas com 100 μL do ZIKV (MOI 1). Na sequência, as placas foram incubadas à 37 °C com 5% de CO_2 por 1 hora, a fim de garantir a adsorção viral. Após, o meio contendo o ZIKV foi removido e as células foram tratadas com 100 μL das soluções das amostras, seguido da adição de 100 μL de meio RPMI suplementado com 2% de SFB. As placas foram, então, incubadas à 37 °C com 5% de CO_2 , por 48 horas. Após este período, foram coletados 100 μL do sobrenadante, que foi imediatamente armazenado no freezer à -80 °C para posterior realização do teste de redução de placas de lise viral (item 4.10.6.3). O pellet celular foi utilizado para avaliação da viabilidade celular nos ensaios de LDH e MTT, conforme descrito no item 4.10.5.

Os ensaios de atividade antiviral foram realizados em duas linhagens celulares diferentes, células Vero CCL-81 e SH-SY5Y, nas concentrações de 3, 10 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos e frações, 1, 10 e 30,0 μM para as substâncias selecionadas e 10 e 30,0 μM para as substâncias isoladas.

O esquema experimental adotado está representado na Figura 13.

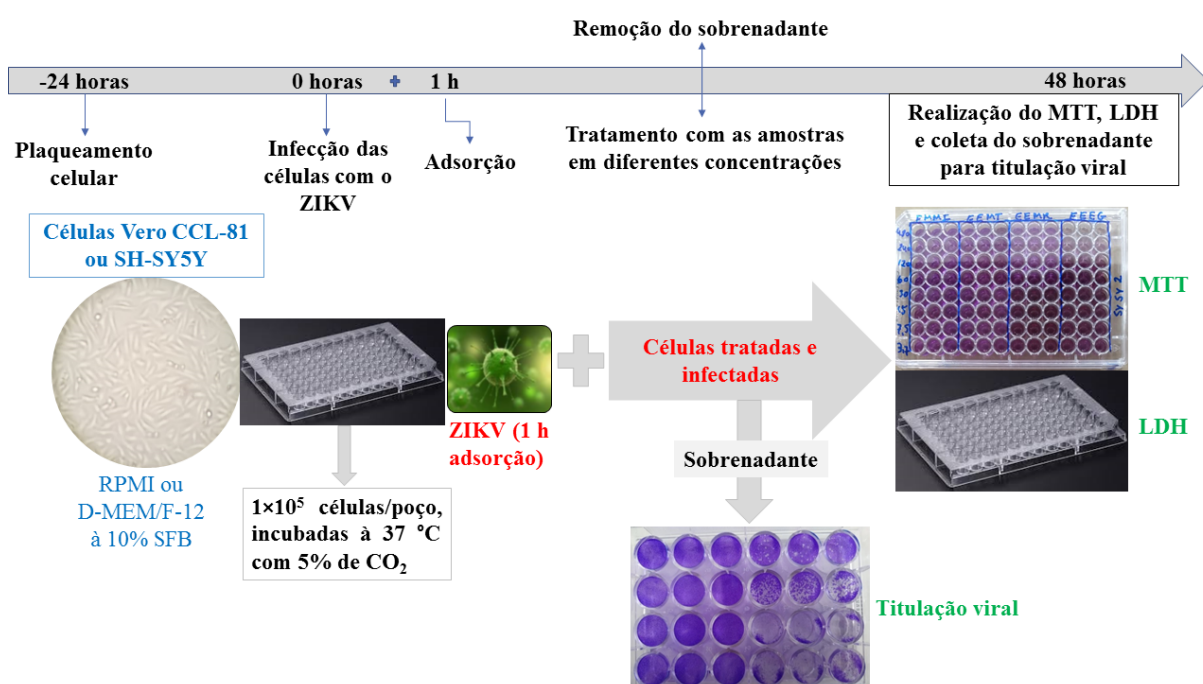


Figura 13. Esquema do ensaio para detecção de atividade antiviral.

A concentração efetiva para 50% das células tratadas (CE_{50}) foi determinada para os extratos e substâncias isoladas que apresentaram atividade antiviral (item 4.10.6.2). A CE_{50} de um extrato ou de uma substância foi definida pela concentração da solução testada capaz de promover uma resposta eficaz em 50% das células infectadas, quando comparada às células infectadas e não tratadas (controle de vírus). Para determinar a CE_{50} dos extratos selecionados

e substâncias isoladas, as linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos (480, 240, 120, 60, 30, 15, 7,5 e 3,725 µg/mL) e substâncias isoladas (300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 e 0,1µM). Os valores de CE₅₀ foram obtidos a partir da análise da regressão não-linear da curva de concentração-resposta, utilizando-se os valores de PFU/mL para cada concentração, conforme cálculo descrito no item 4.10.3. Os valores de CE₅₀ foram calculados com os valores da média da triplicata biológica e triplicata experimental.

De posse dos valores de CC₅₀ e CE₅₀ foi calculado o índice de seletividade (IS). Este expressa a razão entre a concentração da amostra que foi tóxica (CC₅₀) e a concentração que apresentou efeito (CE₅₀) (FERRAZ et al., 2019). Portanto, tal índice é calculado através da fórmula (1):

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

4.10.6.3 Titulação viral

A titulação viral foi realizada em células Vero CCL-81. Inicialmente as células foram cultivadas em placas de 24 poços (5×10⁵ células/poço) até atingir 90 % de confluência. Em seguida, foram adicionados aos poços 300 µL de diluições seriadas dos sobrenadantes (coletados no ensaio antiviral descrito no item 4.10.6.2), preparadas em RPMI sem suplementação com SFB. Nos poços correspondentes ao controle de células foram adicionados 300 µL de meio RPMI sem SFB. Após 1 h de adsorção em estufa 37 °C, em 5% de CO₂, com homogeneização manual a cada 10 min, o meio foi removido e a cada poço foi adicionado 1,0 mL de meio RPMI contendo 1,6% de CMC, seguido de incubação à 37 °C, em 5% de CO₂. Após 4 dias, o meio foi removido e as células foram fixadas em solução de formol a 10 % por 2 horas. Após descarte do sobrenadante, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta (10% formol tamponado e 1% cristal violeta). As placas de lise do ZIKV observadas nos poços foram contadas e a carga viral foi expressa pelo número de unidades formadoras de placas (UFP/mL), conforme descrito no item 4.10.3.

O esquema experimental adotado está representado na Figura 14.

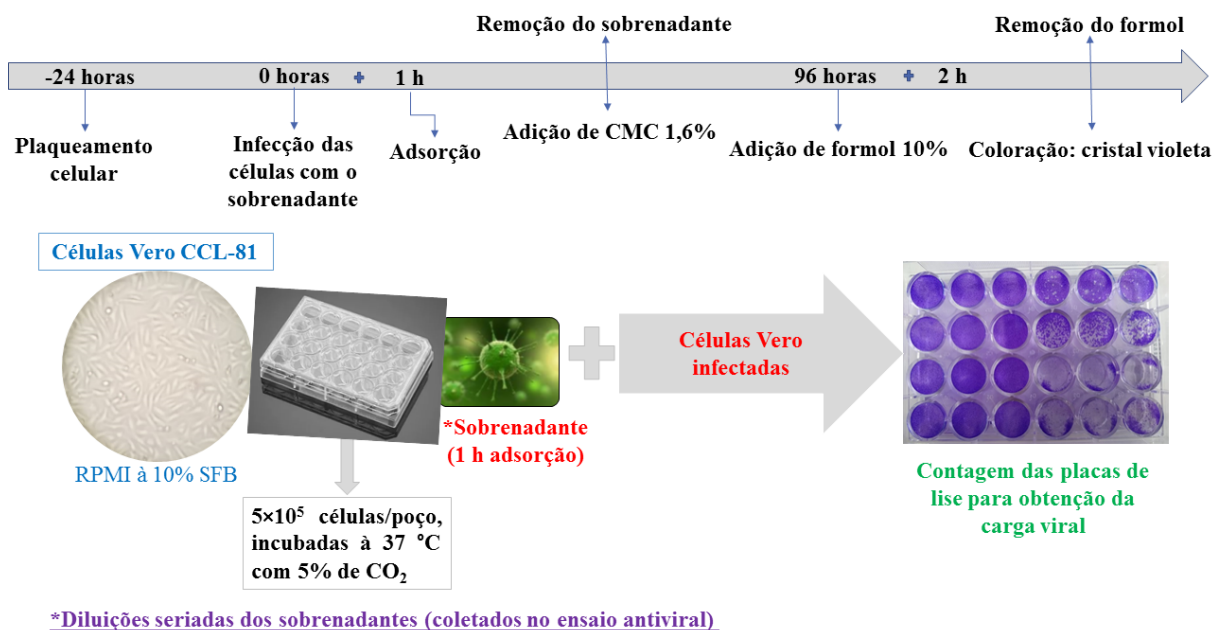


Figura 14. Esquema do ensaio de titulação viral.

4.10.7 Avaliação preliminar do mecanismo de ação

Os extratos ativos foram avaliados quanto a seu efeito profilático e capacidade de inibir a internalização viral.

4.10.7.1 Avaliação do efeito profilático

Células Vero CCL-81 foram plaqueadas, conforme descrito no item 4.10.3. A placa foi então resfriada à 4 °C por 30 minutos, o meio foi removido, e 300 µL de solução do extrato na concentração de 30 µg/mL foram adicionados aos poços referentes às células infectadas com ZIKV e tratadas com o extrato (CVE), e nos poços referentes ao controle de células somente com o extrato (CE). Ainda, 300 µL de meio foram adicionados aos poços referentes ao controle de células infectadas com ZIKV (CV) e ao controle de células não infectadas (CC). A placa foi mantida à 4 °C por 1 hora. Após o período de incubação, o meio com o extrato foi removido e os poços lavados uma vez com PBS, sendo em seguida adicionados 300 µL de solução de vírus (MOI de 1) aos poços CVE e CV, e 300 µL de meio aos poços CC e CE, seguindo-se outra incubação à 4 °C por 1 hora. Ao término da incubação, o meio foi removido e os poços lavados com PBS, sendo então adicionados 500 µL de meio. A placa foi incubada à 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas e, após a incubação, o sobrenadante foi coletado e titulado conforme descrito no item 4.10.6.3.

O esquema experimental adotado está representado na Figura 15.

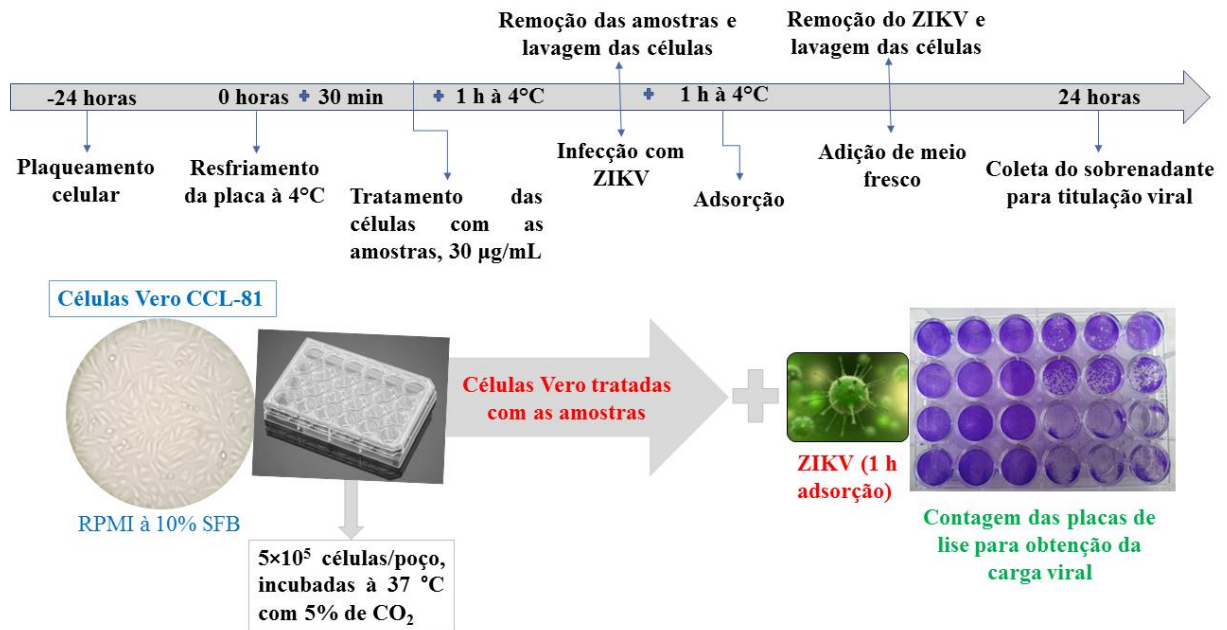


Figura 15. Esquema do ensaio de avaliação do efeito profilático.

4.10.7.2 Avaliação da inibição da internalização viral

Células Vero CCL-81 foram plaqueadas, conforme descrito no item 4.10.3. A placa foi então resfriada à 4 °C por 30 minutos, o meio foi removido e as células foram infectadas com 300 µL de solução de ZIKV (MOI de 1) nos poços referentes ao controle de células infectadas com ZIKV (CV) e controle de células infectadas com ZIKV e tratadas com o extrato (CVE). Ainda, 300 µL de meio foram adicionados aos poços referentes ao controle de células não infectadas e tratadas com o extrato (CE) e controle de células não tratadas e não infectadas (CC). A placa foi mantida à 4 °C por 1 hora. Após o período de incubação, o meio com o ZIKV foi removido e os poços lavados uma vez com PBS, sendo em seguida tratados com 300 µL de solução do extrato na concentração de 30 µg/mL nos poços CVE e CE, e com 300 µL de meio nos poços CC e CV, seguido de incubação à 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação, o meio foi removido, os poços lavados com PBS, lavados com tampão citrato para inativação dos vírus não internalizados, e lavados novamente com PBS. Na sequência, adicionaram-se 500 µL de meio RPMI com 2% de SFB. A placa foi então incubada à 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas e, após a incubação, o sobrenadante foi coletado e titulado conforme descrito no item 4.10.6.3.

O esquema experimental adotado está representado na Figura 16.



Figura 16. Esquema do ensaio de avaliação da inibição da internalização viral.

4.10.8 Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios do MTT e LDH são apresentados como média e erro padrão médio (SEM), exceto para cargas virais, que foram expressos com a mediana. O cálculo da CC₅₀ foi realizado por regressão não-linear e os dados foram comparados por ANOVA unidirecional seguido por teste de Dunnett (controle de células *versus* ZIKV+DMSO e/ou ZIKV+tratado; controle de células *versus* DMSO e/ou tratado) ou por comparações múltiplas por teste Tukey (ZIKV+tratado *versus* ZIKV+DMSO). Estes foram utilizados para determinar o nível de significância da diferença entre as células infectadas e os controles, bem como entre as diferentes concentrações dos grupos tratados, onde *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Resultados com valor de p < 0,05 foram considerados significativos. Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc).

4.11 Estudo fitoquímico dos extratos selecionados

A partir dos resultados dos ensaios de atividade anti-ZIKV foram selecionados para estudo fitoquímico o extrato etanólico de folhas de *Terminalia glabrescens* e o extrato diclorometano de folhas de *Maytenus ilicifolia*.

4.11.1 Obtenção dos extratos

Folhas de *Terminalia glabrescens* foram secas em temperatura ambiente e fragmentadas em moinho de facas. O material vegetal triturado (300 g) foi utilizado para preparação do

extrato por meio de percolação exaustiva com etanol 96 °GL à temperatura ambiente. O percolado foi concentrado em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, à temperatura de 40 °C. O resíduo obtido foi transferido para frasco previamente tarado, e mantido à temperatura ambiente para eliminação do solvente residual. O mesmo procedimento foi realizado com porção adicional de 269,70 g de material vegetal. As massas e rendimentos obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Folhas de *Maytenus ilicifolia* (350 g) foram inicialmente desgorduradas pela percolação com 1 L de *n*-hexano por 24 horas. O processo foi repetido por mais 24 horas e o todo eluato foi removido. Na sequência, o material vegetal desgordurado foi submetido à percolação exaustiva com diclorometano. O eluato foi concentrado em evaporador rotativo e o resíduo foi transferido para um frasco. As massas e rendimentos obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento extrativo da percolação de folhas de *Terminalia glabrescens* e *Maytenus ilicifolia*.

Espécie	Percolação	Solvente	Material vegetal (g)	Extrato obtido (g)	Rendimento (% m/m)
<i>Terminalia glabrescens</i>	P1	Etanol	300	84,3	28,1
	P2	Etanol	269,70	72,8	27
	P1	HEX	350	3,5	1,0
<i>Maytenus ilicifolia</i>	P1	DCM		6,5	1,8
	P2	HEX	350	3,0	0,8
	P2	DCM		6,3	1,8

4.11.2 Fracionamento preliminar de *T. glabrescens* por partição líquido/líquido

O extrato etanólico seco de *T. glabrescens* foi anteriormente fracionado por partição líquido-líquido sequencial entre solventes imiscíveis (GOMES et al., 2021). Uma porção (2,0 g) do extrato foi solubilizado em 50,0 mL de solução MeOH/H₂O (3:7, v/v) e a solução foi mantida em banho de ultrassom por 10 min para completa solubilização. Posteriormente, a solução hidrometanólica foi particionada sequencialmente com *n*-hexano (HEX), diclorometano (DCM) e acetato de etila (EtOAc) (3 × 50 mL cada), originando as frações

FrHEX, FrDCM, FrEtOAc, respectivamente, além da fração hidrometanólica (FrMeOH:H₂O) restante (GOMES et al., 2021). Estas frações foram anteriormente preparadas por Gomes (2021) e foram avaliadas no ensaio antiviral *in vitro*. Para realização do estudo fitoquímico, foi necessário obter massa adicional dessas frações, sendo empregada coluna de filtração para este propósito (vide item 4.11.3).

4.11.3 Fracionamento preliminar de *T. glabrescens* por filtração em coluna de sílica gel

O extrato seco P1 de *T. glabrescens* (Tabela 3) foi submetido à filtração em sílica gel *flash*. Uma porção de extrato (50 g) foi solubilizada em 70 mL de metanol com auxílio de banho de ultrassom, sendo então adicionados 22,5 g de sílica para incorporar ao extrato. Após remoção do solvente, o extrato foi depositado no topo de uma coluna previamente empacotada com sílica gel *flash* (150 g; d.i. 5,5 cm), procedendo-se à eluição sequencial com 2 L de *n*-hexano, 3 L de diclorometano, 1 L de acetato de etila e 1 L de metanol. A eluição com diclorometano gerou duas frações com colorações distintas, denominadas de DCM A (coloração amarela) e DCM B (coloração verde). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, à temperatura de 40 °C. O resíduo obtido foi transferido para frasco previamente tarado, e mantido coberto com papel alumínio (com pequenos furos) em temperatura ambiente, para eliminação do solvente residual. Este mesmo procedimento foi realizado com o extrato vegetal seco da percolação 2.

O rendimento extrativo das frações obtidas por coluna de filtração de *T. glabrescens* está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Rendimento das frações obtidas por filtração em coluna de sílica gel *flash* do extrato de folhas de *T. glabrescens*.

Código	Coluna de filtração (n°)	Fração obtida (mg)	Rendimento (% m/m)
FrHEX	F1	80,4	0,1
	F2	103,2	0,2
FrDCM A	F1	830,3	1,6
	F2	543,4	1,0
FrDCM B	F1	376,1	0,7
	F2	314,5	0,6

Tabela 4. Continuação

FrEtOAc	F1	1.189,0	2,3
	F2	927,1	1,8
FrMEOH	F1	38.590,0	77,1
	F2	40.890,0	81,7

A fração diclorometânica obtida por partição (4.11.2) apresentou perfil cromatográfico por CCD semelhante à combinação das frações cromatográficas FrDCM A e FrDCM B. Portanto, considerou-se que elas apresentavam os mesmos constituintes e essas frações foram empregadas para isolamento dos constituintes.

4.11.3.1 Refracionamento de FrDCM A e FrDCM B

Os resultados dos ensaios *in vitro* indicaram que a fração diclorometânica de *T. glabrescens* foi ativa frente ao ZIKV em ambas as linhagens de células Vero CCL-81 e SH-SY5Y. Por esse motivo, as FrDCM A e FrDCM B foram selecionadas para refracionamento.

4.11.3.1.1 Refracionamento de FrDCM A

Uma porção (750 mg) da fração diclorometânica A (FrDCM A; item 4.11.3) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel *flash* (250-400 Mesh) (70 g; 52 × 1,8 cm d.i.), procedendo-se à eluição com o gradiente descrito na Tabela 5. Foram coletadas frações de 12 mL cada.

Tabela 5. Frações obtidas do refracionamento de FrDCM A por cromatografia em coluna de sílica gel *flash*.

Eluente	Proporção (%)	Frações coletadas
HEX	100	1 a 5
HEX:EtOAc	99,5:0,5	6 a 17
HEX:EtOAc	99:1	18 a 44
HEX:EtOAc	98,5:1,5	45 a 67
HEX:EtOAc	98:2	68 a 111
HEX:EtOAc	97,5:2,5	112 a 128
HEX:EtOAc	97:3	129 a 145
HEX:EtOAc	96,5:3,5	146 a 156

Tabela 5. Continuação

HEX:EtOAc	95:5	157 a 184
HEX:EtOAc	90:10	185 a 227
HEX:EtOAc	85:15	228 a 241
HEX:EtOAc	80:20	242 a 257
HEX:EtOAc	70:30	258 a 270
HEX:EtOAc	1:1	271 a 276
EtOAc	100	277 a 281

As frações coletadas foram agrupadas de acordo com a similaridade do perfil obtido em CCD de sílica gel, após revelação com anisaldeído sulfúrico. Após os agrupamentos, a composição das frações mais promissoras foi analisada por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas. O rendimento das frações obtidas pela cromatografia líquida em coluna foi de aproximadamente 75,4%. O resumo do processo agrupamento das frações de FrDCM A está listado na Tabela 6.

Tabela 6. Agrupamento das frações resultantes do refractionamento de FrDCM A.

Frações	Grupo	Massa do grupo (mg)	Frações	Grupo	Massa do grupo (mg)
F1 – F5	GF5	47,5	F166 – F172	GF172	6,5
F6 – F12	GF12	2,8	F173 – F180	GF180	9,2
F22 – F30	ND-D	-	F181 – F183	GF183	4,0
F31 – F32	GF32	3,2	F184 – F195	GF195*	28,1
F33 – F67	ND-D	-	F196 – F200	GF200	6,1
F68 – F74	GF74#	176,2	F201 – F202	GF202	17,0
F75 e F76	GF76	19,5	F203 – F205	GF205	17,9
F77 – F85	GF85#	16,4	F206	GF206	5,2
F86 – F94	GF94#	15,1	F207 – F213	GF213	19,9
F95 – F103	GF103	10,8	F214 – F219	GF219	8,6
F104 – F113	GF113	7,9	F220 – F223	GF223	5,3
F114 e F115	GF115	2,7	F224	GF224	2,3
F116 – F120	GF120	5,3	F225 – F231	GF231*	11,1
F121 – F130	GF130	8,0	F232 – F235	GF235	2,2
F131 – F138	GF138	7,4	F236	GF236	1,4

Tabela 6. Continuação

F139	GF139	0,8	F237 – F251	GF251	17,6
F140 – F154	GF154*	12,3	F252 – F256	GF256	11,9
F155 – F157	GF157	2,8	F257 – F272	GF272	27,5
F158 – F165	GF165	6,4	F273 – F281	GF281	18,4
Total			565,3		

Legenda: ND-D = não foi identificado manchas na CCD – Descarte; # analisadas por CG-EM; * analisadas por RMN.

4.11.3.1.2 Refracionamento de FrDCM B

Uma porção de FrDCM B (500 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel *flash* (250-400 Mesh) (50 g) empacotada em coluna de vidro de diâmetro interno (\varnothing) de 1,8 cm, e eluída com o gradiente informado na Tabela 7. Foram coletadas 251 frações de 12 mL cada.

Tabela 7. Frações obtidas da cromatografia em coluna de FrDCM B.

Eluente	Proporção (%)	Frações coletadas
HEX:EtOAc	95:5	1 a 21
HEX:EtOAc	92,5:7,5	22 a 51
HEX:EtOAc	90:10	52 a 133
HEX:EtOAc	87,5:12,5	134 a 164
HEX:EtOAc	85:15	165 a 186
HEX:EtOAc	80:20	187 a 207
HEX:EtOAc	75:25	208 a 225
HEX:EtOAc	70:30	226 a 243
HEX:EtOAc	1:1	244 a 246
EtOAc	100	247 a 249
MEOH	100	250 a 251

O rendimento das frações obtidas pela cromatografia líquida em coluna foi de aproximadamente 85%. As frações coletadas foram agrupadas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico em CCD, após revelação com anisaldeído sulfúrico. Após os agrupamentos, a composição química das frações mais promissoras foi analisada por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas. O resumo do processo agrupamento das frações de FrDCM B está listado na Tabela 8.

Tabela 8. Agrupamento das frações resultantes do refração de FrDCM B.

Frações	Grupo	Massa do grupo (mg)	Frações	Grupo	Massa do grupo (mg)
F1-F9	GF9#	24,5	F77 – F83	GF83	6,1
F10 – F12	GF12	1,6	F84 – F92	GF92	14,2
F13	GF13	1,1	F92 – F101	GF101	12,6
F14	GF14	1,0	F102 – F110	GF110	14,8
F15 – F21	GF21	3,3	F111 – F119	GF119	14,5
F22 – F26	GF26	2,9	F120 – F129	GF129	13,2
F27 e F31	GF31	1,7	F130 – F138	GF138	11,7
F32 – F35	GF35	7,2	F139 – F146	GF146	6,8
F36	GF36	3,4	F147	GF147	0,2
F37 – F39	GF39#	2,6	F148 – F152	GF152	4,8
F40	GF40	2,4	F153 – F155	GF155	2,7
F41 – F45	GF45	9,3	F156 e F157	GF157	3,0
F46 – F47	GF47	2,4	F158 – F163	GF163	7,3
F48 – F52	GF52#	5,0	F164	GF164	0,4
F53 – F56	GF56#	2,7	F165 – F169	GF169	3,6
F57 – F62	GF62	17,3	F170 – F173	GF173	2,7
F63	GF63	7,7	F174 – F177	GF177	5,3
F64 – F69	GF69	10,6	F178 – F181	GF181	8,7
F70 – F75	GF75	7,7	F182 – F251	GF251	176,3
F76	GF76	4,5			
Total			427,8		

Legenda: # analisadas por CG-EM.

4.11.4 Fracionamento do extrato diclorometânico de *M. ilicifolia*

Uma porção de 10 g do extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia* foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel *flash* (250-400 Mesh; 600 g; d.i. 5,5 cm), procedendo-se à eluição com o gradiente descrito na Tabela 9. Foram coletadas 443 frações de 18 mL cada.

Tabela 9. Frações obtidas do fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia* por cromatografia em coluna de sílica gel *flash*.

Eluente	Proporção (%)	Frações coletadas
HEX	100	1
HEX:EtOAc	98:2	2
HEX:EtOAc	95:5	3 a 5
HEX:EtOAc	90:10	6 a 9
HEX:EtOAc	85:15	10 a 17
HEX:EtOAc	80:20	18 a 186
HEX:EtOAc	75:25	187 a 270
HEX:EtOAc	70:30	271 a 306
HEX:EtOAc	1:1	307 a 355
EtOAc	100	356 a 380
MEOH	100	381 a 443

Durante o processo de eluição, a partir da fração 55 até a fração 443, dois sólidos começaram a ficar aderido ao redor da saída da coluna de vidro, ambos foram coletados e posteriormente analisados por CCD, um sólido tinha aspecto branco e o outro tinha aspecto esverdeado. O rendimento das frações obtidas foi de aproximadamente 83%. As frações foram agrupadas de acordo com a similaridade do perfil cromatográfico observado por CCD, após revelação com anisaldeído sulfúrico. Após os agrupamentos, a composição química das frações mais promissoras foi avaliada por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas. Os grupos de frações reunidos estão listados na Tabela 10.

Tabela 10. Agrupamento das frações resultantes do fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia*.

Frações	Grupo	Massa do grupo (mg)	Frações	Grupo	Massa do grupo (mg)
F1 – F3	GF3	3,9	F146	GF146	29,0
F4	GF4	2,8	F147 – F154	GF154	236,7
F5 – F10	GF10#	45,5	F155 – F183	GF183	540,2
F11– F15	GF15	2,4	F184 – F187	GF187	35,3
F16	GF16	2,4	F188 – F198	GF198	84,5

Tabela 10. Continuação

F17 e F18	GF18	6,7	F199 – F206	GF206	75,6
F19 – F27	GF27	36,7	F207	GF207	8,2
F28	GF28	6,7	F208	GF208	10,7
F29 – F33	GF33#	37,4	F209 – F211	GF211	21,8
F34 – F40	GF40#	869,5	F212	GF212	7,1
F41 – F53	GF53	358,3	F213 – F227	GF227	107,2
F54 e F55	GF55	63,9	F228 – F246	GF246	124,3
F56 – F61	GF61	195,3	F247 – F256	GF256	70,4
F62 – F66	GF66	155,5	F257 – F272	GF272	90,0
F67 – F77	GF77	357,4	F273 – F279	GF279	50,2
F78 e F79	GF79	52,3	F280 – F288	GF288	52,5
F80 – F87	GF87	229,4	F289 – F293	GF293	25,5
F88 – F90	GF90	85,9	F294 – F299	GF299	22,2
F91 – F102	GF102	324,8	F300 – F311	GF311	26,8
F103	GF103	25,3	F312 – F327	GF327	31,9
F104	GF104	24,4	F328 – F333	GF333	13,5
F105 – F109	GF109	122,3	F334 – F340	GF340	24,2
F110	GF110	29,8	F341 – F357	GF357	186,5
F111 – F113	GF113	73,3	F358 – F377	GF377	237,6
F114	GF114	23,7	F378 – F381	GF381	25,2
F115 – F117	GF117	107,7	F382 – F387	GF387	35,4
F118 – F124	GF124	246,0	F388 – F394	GF394	37,9
F125 – F129	GF129	125,9	F395 – F443	GF443	1916,8
F130 – F134	GF134	164,4	Sólido 1	SOL1*	45,0
F135 – F138	GF138	134,4	Sólido 2	SOL2	20,7
F139 – F145	GF145	224,7			
Total			8331,6		

Legenda: # analisadas por CG-EM; * analisadas por RMN.

4.11.5 Análise de extratos e frações por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

A composição química do extrato diclorometano de *M. ilicifolia* e do extrato etanólico e frações (FrEtOAc e FrMEOH) de *T. glabrescens* foi caracterizada por UPLC-DAD-ESI-MS/MS usando fonte de ionização por eletrospray (ESI).

Inicialmente, foi realizado o perfil exploratório dos extratos, diclorometano de *M. ilicifolia* e etanólico de *T. glabrescens*, afim de verificar a composição química de ambos. Com base nisso, foi realizado o monitoramento de reações múltiplas (MRM). Para tanto, uma porção de cada extrato (5 mg) foi transferido para um tubo plástico do tipo *safe-lock*, sendo o extrato de *M. ilicifolia* solubilizado em 2,0 mL de metanol e o extrato de *T. glabrescens* solubilizado em 2,0 mL de metanol/água (1:1, v/v). A solução foi submetida à sonicação por 15 minutos e centrifugada à $8400 \times g$ por 10 minutos. Após filtração em membrana de $0,45 \mu\text{M}$, uma alíquota (4 μL) do sobrenadante foi injetada no sistema de UPLC e analisada empregando as condições descritas a seguir.

A separação cromatográfica foi realizada em equipamento Waters Acquity UPLC system (Waters, USA), composto de bomba binária, amostrador automático, linha de degaseificador, equipado com detector de arranjo de fotodiodos e acoplado a detector Xeco Triplo Quadrupole MS (Waters). As análises foram realizadas em coluna Acquity UPLC HSS C18 ($2,1 \times 50 \text{ mm d.i.}$, $1,7 \mu\text{m}$; Waters) à $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a análise do perfil exploratório, a fase móvel foi constituída de água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo ácido fórmico a 0,1% v/v e a eluição, com fluxo de $0,3 \text{ mL/min}$, foi realizada no modo gradiente, a saber: 5 a 95 % de B (0 - 10 min), retornando às condições iniciais (95% a 5 % B em 1 min) e intervalo de re-equilíbrio de 2 min foi adotado entre as corridas cromatográficas, perfazendo um tempo total de 13 min.

No extrato diclorometano de *M. ilicifolia* os compostos foram identificados por monitoramento de reações múltiplas (MRM) no modo de ionização positiva, usando transições íon precursor e produto previamente descritos para os compostos de referência (SILVEIRA et al., 2020). A fase móvel também foi constituída de água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo ácido fórmico a 0,1% v/v e a eluição, com fluxo de $0,3 \text{ mL/min}$, foi realizada no modo gradiente: 25 a 75 % de B (0 - 10 min), 75 a 99 % de B (10 - 35 min) e depois retornando às condições iniciais (99 % a 25 % B em 1 min). O intervalo de re-equilíbrio de 4 min foi adotado entre as corridas cromatográficas, perfazendo um tempo total de 40 min.

O espectro das substâncias detectadas no UV foi registrado no comprimento de onda de 190-500 nm. As análises de MS foram realizadas utilizando detector triplo quadrupolo equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI). Os cromatogramas foram registrados em modo de varredura completa com o espectrômetro operando no modo de ionização positiva. O fluxo de gás do cone foi ajustado para 50 L/h e o fluxo de gás de dessolvatação para 600 L/h a $400 \text{ }^\circ\text{C}$. A voltagem capilar foi ajustada para $3,50 \text{ kV}$, enquanto a voltagem de gás do cone foi de 60 V , a temperatura da fonte foi de $120 \text{ }^\circ\text{C}$, e a temperatura de dessolvatação foi ajustada

para 300 °C. Os compostos foram identificados por monitoramento de reações múltiplas (MRM) usando transições de íons específicas descritas por Silveira et al., (2020).

Procedimento semelhante foi empregado para o extrato e frações de *T. glabrescens* e com algumas modificações. Uma porção do extrato *T. glabrescens* e das frações (aproximadamente 5 mg) foi transferida para um tubo plástico do tipo *safe-lock* e solubilizada em 2,0 mL de metanol/água (1:1, v/v). As análises foram realizadas seguindo protocolo adotado por Singh et al. (2016a), com modificações. A eluição foi realizada com água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo ácido fórmico a 0,1% v/v, com fluxo de 0,3 mL/min, no modo gradiente: 5 a 10 % de B por 12 min, 10 a 20 % B por 8 min, 20 a 25 % B por 5 min, 25 a 30 % B por 3 min, 30 a 35 % B por 4 min, 35 a 40 % B por 13 min, 40 a 95 % B por 5 min, 95 % de B mantido durante 5 min, e retornando às condições iniciais (5 % de B) em 1 min. O intervalo de re-equilíbrio de 4 min foi adotado entre as corridas cromatográficas, perfazendo um tempo total de 60 min. As análises de MS foram operadas em modo de ionização negativo. O fluxo de gás do cone foi ajustado para 60 L/h.

A voltagem do capilar foi ajustada para 4500 V, enquanto a voltagem de gás do cone foi usada no modo de rampa ou ajustada para um valor otimizado, de acordo com o composto identificado (vide Tabela 13, item 5.4.1.1 na seção de Resultados). Os dados de fragmentação MS/MS foram obtidos na faixa de massa de 70 a 1245 m/z , de acordo com os íons. Inicialmente, as substâncias foram identificadas por monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizando transições de íons específicas já descritas na literatura (BAJKACZ et al., 2018; SOBEH et al., 2019; CHANG et al., 2019; IGLESIAS-CARRES et al., 2019, PEREIRA et al., 2020).

Para confirmar as substâncias identificados através do MRM foram realizados os experimentos com íons produto, realizados com energia de colisão fixa e energia de colisão em rampa com 0,5 s de tempo de varredura, de acordo com a substância identificada. A detecção por EM foi realizada no modo de ionização negativa de varredura na faixa de massa de m/z 100-1250 Da.

A identificação das substâncias de *T. glabrescens* (vide Tabela 13, item 5.4.1.1 na seção de Resultados) foi baseada nas análises dos perfis espectrais de cada um deles e por comparação com dados da literatura (BAJKACZ et al., 2018; SOBEH et al., 2019; CHANG et al., 2019; IGLESIAS-CARRES et al., 2019 e PEREIRA et al., 2020).

4.11.6 Análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas no cromatógrafo GC-MS-QP2010 ULTRA (Shimadzu), contendo as bibliotecas espectrais NIST-14 e NIST-27 (*Special Database*),

FFNSC (*Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*) e Wiley Library do programa LabSolution/CGMS Solution, versão 4.20. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química, UFMG, em parceria com as Professoras Dra. Lucienir Duarte Pains e Dra. Grasiely Farias de Sousa.

As amostras foram analisadas como derivados sililados. Uma alíquota de 25 µL de solução da amostra (1 mg solubilizada em 100 µL de clorofórmio) foi transferida para um tubo criogênico e evaporada em temperatura ambiente. Em seguida, 25 µL do agente sililante N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e 25 µL de piridina foram adicionados ao tubo e a reação foi conduzida em forno de micro-ondas doméstico (ELETROLUX MT030), na potência de 30%, por 3 minutos. A amostra sililada foi imediatamente injetada e analisada por CG-EM.

Para as análises, foi utilizada uma coluna capilar NST-05 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, com fase estacionária composta por um filme de dimetilpolisiloxano (95%) e difenil (5%) com 0,25 µm de espessura (Restek). A temperatura do injetor empregada foi de 250 °C Split (1:50 e 1:100), o fluxo de gás hélio de 0,71 mL/min, o aquecimento do forno/coluna na faixa de 50 °C (0 min) a 280°C (25 min), com programação linear de temperatura de 3 °C/min, e o volume de injeção de 1,0 µL. A temperatura da interface e a fonte de íons do detector (impacto eletrônico a 70 eV) foram ajustadas para 250 °C. A identificação dos constituintes foi realizada por comparação entre os índices de retenção obtidos e pela análise do espectro de massas e comparação com aqueles disponíveis no banco de dados e, também, pelo site do NIST (NIST-EUA: <http://www.nist.gov/>), levando em consideração o percentual de similaridade ($S \geq 85\%$) do provável constituinte identificado.

As seguintes amostras foram analisadas por CG-EM: GF74, GF85, GF94 (tabela 6), GF9, GF39, GF52, GF56 (tabela 8), GF10, GF33 e GF40 (tabela 10).

4.11.7 Análises dos compostos isolados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A elucidação estrutural das substâncias isoladas de *T. glabrescens* (GF154, GF195 e GF231; Tabela 6) e *M. ilicifolia* (SOL1; Tabela 10) foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (150 MHz) e subespectros DEPT-135 (150 MHz), bem como dos experimentos bidimensionais COSY, HSQC e HMBC. As análises foram realizadas no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em espectrômetro de RMN Bruker, modelo Ascend™ 600 MHz, à 25°C, empregando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) para solubilização das amostras. Todos os experimentos de RMN foram realizados pelo Prof. Dr. José Dias de Souza Filho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção das espécies para estudo

A partir da abordagem quimiosistemática foram selecionadas para estudo 30 espécies vegetais, pertencentes às famílias Alismataceae (*Echinodorus grandiflorus*), Apocynaceae (*Hancornia speciosa*), Asteraceae (*Baccharis altimontana*, *B. brevifolia*, *B. calvescens*, *B. dracunculifolia*, *B. hemiptera*, *B. imbricata*, *B. intermixta*, *B. magnifica*, *B. myriocephala*, *B. opuntioides*, *B. parvidentata*, *B. platypoda*, *B. reticularia*, *B. retusa*, *B. serrulata*, *Symphyopappus brasiliensis*, *S. lymanmithii*), Celastraceae (*Maytenus acanthophylla*, *M. ilicifolia*, *M. rígida*, *M. truncata*), Combretaceae (*Terminalia glabrescens*, *T. phaeocarpa*), Erythroxyloaceae (*Erythroxyllum deciduum*, *E. tortuosum*), Malvaceae (*Sida glaziovii*), e Ochnaceae (*Ouratea castaneifolia*, *O. spectabilis*). A partir destas 30 espécies foram obtidos 37 extratos. Na Tabela 11 estão listados os principais metabólitos secundários identificados e/ou isolados das espécies selecionadas, ou de outras do mesmo gênero, já relatados na literatura.

A ocorrência de triterpenos, esteroides e polifenóis, bem como a atividade anti-inflamatória relatada para algumas dessas espécies, ou para outras espécies dos gêneros, foram os critérios adotados para seleção das mesmas (Tabela 11). Priorizou-se plantas com atividade anti-inflamatória relatada, uma vez que o efeito antiviral de alguns produtos naturais é atribuído às respostas anti-inflamatórias induzidas nas células hospedeiras e não está necessariamente relacionado com a redução da carga viral (MARTINEZ et al., 2015; WICHIT et al., 2021). A triagem inicial foi realizada com os extratos brutos já que existem dados da literatura indicando que a atividade antiviral pode ser detectada em extratos complexos (CLAIN et al., 2018; CLAIN et al., 2019; FERREIRA et al., 2019; HADDAD et al., 2019a). Essa abordagem permitiu selecionar os extratos mais ativos para fracionamento posterior, visando o isolamento dos constituintes bioativos. Além dos extratos brutos, também foram avaliados na triagem inicial algumas substâncias selecionadas das espécies avaliadas, ou de outras do mesmo gênero.

Assim, os extratos brutos (Tabela 1), as substâncias selecionadas e uma mistura de triterpenos pentacíclicos (Tabela 2) foram avaliados nos ensaios *in vitro* de detecção de citotoxicidade e atividade antiviral.

Tabela 11. Principais constituintes químicos relatados na literatura para as espécies selecionadas para estudo ou para outras espécies do gênero.

Espécie	Principais constituintes	Referência
<i>Hancornia speciosa</i>	Rutina, L-(+)-bornesitol, ácido quínico, ácido clorogênico, canferol-3- <i>O</i> -rutinosídeo, ácidos gálico, siríngico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico e 5- <i>O</i> -cafeoilquínico, <i>cis</i> -clorogenato de metila, <i>trans</i> -clorogenato de metila, α -amirina, 2,7-diidroxixantona, 2,7-dimetoxixantona, procianidinas do tipo B, lupeol, mistura de hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa, óxido de <i>trans</i> -linalol óxido de <i>cis</i> -linalol, α -terpinol, linolol, geraniol, metil-antranilato, eugenol, isoeugenol.	ENDRINGER, 2007; RODRIGUES et al., 2006; BARROS, 2008; SANTOS et al., 2006.
<i>Terminalia argentea</i>	Ácido gálico, rutina, ácido elágico, quercetina, ácido cafeico, ácido quínico, corilagina, punicalina, punicalagina.	BESERRA et al., 2018
<i>Terminalia glabrescens</i>	Triterpenos do tipo oleanano (3 β ,6 β ,23,28-tetrahidroxiolean-12-eno) e ursano (ácido 2 α -hidroxiursólico), ácido sumaresinólico, éster metílico do ácido sumaresinólico, ácido 3 β ,6 β ,23-triidroxiolean-12-en-28-óico, ácido arjunólico, sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo, hidrocarbonetos, arjunglicosídeo, aglicona do asiaticosídeo, estigmastano-3 β -6 α -diol, friedelina, taraxerol, lupeol, lupenona, betulina, betulona, ácido betulínico, β -sitosterol, (-) catequina.	GARCEZ et al., 2003
<i>Erythroxylum</i> spp.	Alcaloides tropânicos, terpenos, taninos, fenilpropanoides, 7-oxo-16-hidroxi-abiet-15(17)-en-19-al, 7-oxo-abiet-15(17)-en-16-ol, 7 α ,16-diidrox-abiet-15(17)-en-19-al, 7 α ,15 β -	OLIVEIRA et al., 2010; EVANS, 1981; ANSELL et al., 1993;

Tabela 11. Continuação

	diidroxicaur-16-en-19-oato de metila, ombuina-3-rutinosídeo, rutina, 3 β ,6 β -ditigloiloxinortropano, 3 β ,7 β -ditigloiloxinortropano, ácido 4-hidroxihipurínico, metilecgonidina, tropacocaina.	NASCIMENTO et al., 2012; ZUANAZZI et al., 2001.
<i>Sida</i> spp.	Alcaloides, flavonoides, esteroides, fenetilamina, N-metil-3-fenetilamina, efedrina, vasicinol, vasicinona, vasicina, colina, betaína.	DINDA et al., 2015; PRAKASH et al., 1981.
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Fitol, esqualeno, limoneno, estigmasterol, friedelan-3-ol, friedelina, fridelan-3-ona, ácido palmítico, acetato de geranila, mauritianina, trifolina, hiperina, epicatequina, tetraglicosídeo do canferol, galactitol, α -tocoferol, simiarenol, lupeol, lupenona, β -amirina, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, esqualeno, ácido hexadecanoico, maytenina, pristimerina.	MOSSI et al., 2010; LEITE et al., 2010; CORDEIRO et al., 1999; SANTOS et al., 2013.
<i>Maytenus truncata</i>	3 β -Friedelinol, 3 α -friedelinol, quercetina-3- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> -glicopiranosil- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> -galactopiranosídeo, canferol-3- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> -glicopiranosil- <i>O</i> -ramnopiranosil- <i>O</i> -galactopiranosídeo, dulcitol.	SALAZAR et al., 2000; FONSECA et al., 2007.
<i>Maytenus rigida</i>	4'-Metilepigalocatequina, rigidinol, ácido betulínico, lup-20(29)-ano-3 β ,30-diol, lup-20(29)-ano-3 β ,28-diol, friedelan-3-ona, friedelan-3- β -ol.	de ROCHA et al., 2012; GONZÁLEZ et al., 1982; MARTUCCIELLO et al., 2010.

Tabela 11. Continuação

<i>Maytenus acanthophylla</i>	<p>β-Sitosterol, ácidos graxos, 4'-<i>O</i>-metil(-)-epigalocatequina, 20-hidroxi-20-epitingenona, galactitol, rigidinol, pristimerina, tingenona, nepeticina, olean-9(11):12-dien-3β-ol, urs-9(11):12-dien-3β-ol, 1,4-<i>trans</i>-poliisopreno.</p>	<p>de OLIVEIRA et al, 2006; NIERO et al., 2011</p>
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	<p>Isovitexina, equinodol, ácido hardwickiico, ácido (-)-16-hidroxicleroda-3,13-dien-16,15-olide-18-oico, (4α,6α,8α)1-carboxi-5(S)-[2(2,5-diidro-5-hidroxi-2-oxo-4-furanil)etil-5,6,8a-trimetil-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidronaftaleno], ácido equinóico, orientina, isoorientina, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido 2-<i>O</i>-cafeoiltartárico, ácido 2-<i>O</i>-feruloiltartárico, ácido cafeoilferuloil-tartárico, ácido di-feruloiltartárico, ácido chicórico, swertisina, isoorientina-7,3'-dimetil éter, swertiajaponina, ácido <i>trans</i>-aconítico, cariofileno, (E)-nerolidol, α-humuleno.</p>	<p>MARQUES et al., 2017</p>
<i>Baccharis</i> spp.	<p>α-Pino, β-pino, mirreno, limoneno, E-pinocarveol, mirtenol, E-cariofileno, β-santaleno, γ-murolo, valenceno, δ-cadineno, isômero de nerolidol, E-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol, khusimona, β-oploopenona, epi-α-cadinol, β-murolo, cubenol, 14-hidroxi-(z)-cariofileno, ácido caféico, ácido felúrico, ácido <i>p</i>-cumárico, bacarina, artepelina C, ácido clorogênico, quercetina, luteolina, apigenina, acetato de carquejila, ácido <i>p</i>-cumárico, drupanina, plicatina B, nevadensina, gardenina B, pectolinaringenina, penduletina, apigenina-</p>	<p>SANTOS et al., 2012; LEMOS et al., 2007; RABELO e COSTA, 2018; FERESIN et al., 2003; RAHALISON et al., 1995; WEIMANN et al., 2002; GARCÍA et al., 2005</p>

Tabela 11. Continuação

	4,7-dimetil éter, naringenina-4,7-dimetil éter, cirsimaritina, pulegona, α -terpineol.	
<i>Symphiopappus lymanmithii</i>	Germacreno D, biciclogermacreno, α -humuleno, tridecapentaneno, ácidos graxos, ácido betulínico, 5,4'-dihidroxi-7-metoxiflavona, luteonila, 3-12-metilbutiriloxil-preeupatundin10 α ,14-epóxido (guaianolídeo), ácido 2 α ,16-diidroxi-3 α ,4 α -epoxikolavênico lactona, 15-ácido 2 α ,16-diidroxi-3 α ,4 α -epoxikolavênico lactona, 2 α -hidroxi-3 α ,4 α -epoxi-13,14-dihidrokolavenol, 17-hidroxi-13,14-dihidrokolavenol, ácido 13Z-sinfioreticúlico, ácido 13E-sinfioreticúlico, 17-hidroxi-13,14-diidrokolaven-15-ol.	BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN et al., 1984; MESQUITA et al., 1986
<i>Ouratea spectabilis</i>	Biflavonoides: 6,6'-bigenkanina, 7,7'-dimetoxigatisflavona, ourateína A, ourateína B, ourateína C e ourateína D.	SIMONI, et al., 2002; ROCHA et al., 2020.
<i>Ouratea castaneifolia</i>	Friedelina, 3 β -friedelinol, α -amirina, β -amirina, lupeol, germanicol, taraxerol, sitosterol, estigmasterol, sitosterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo, estigmasterol 3-O- β -D-glicopiranosídeo, 5,7,4'-trimetoxiisoflavona, 5,4'-diidroxi-7,3',5'-trimetoxiflavona, amentoflavona, 7,7''-O-dimetilamentoflavona, heveaflavona, tetrametilamentoflavona.	NASCIMENTO et al., 2009.

5.2 Avaliação da citotoxicidade dos extratos em células Vero CCL-81

Os extratos brutos, as substâncias isoladas e a mistura de triterpenos foram inicialmente avaliados quanto à citotoxicidade em células Vero CCL-81 pelos métodos do MTT e LDH. Os extratos e uma mistura de triterpenos (friedelina+friedelinol) foram avaliados nas

concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL (Figura 17). Essa faixa de concentração foi definida com base no estudo de Cos e colaboradores (2006), que aborda como critérios de avaliação de triagem farmacológica, utilizar concentrações abaixo de 100 mg/mL para extratos e abaixo 25 µM para compostos puros. Os extratos de *B. altimontana* (5), *B. calvescens* (8), *B. dracunculifolia* (9), *B. hemiptera* (10), *B. imbricata* (11), *B. magnifica* (13), *B. myriocephala* (14), *B. opuntioides* (15), *B. parvidentata* (16), *B. platypoda* (17), *B. retusa* (19), *S. lymansmithii* (22) e *M. ilicifolia* (diclorometânico) (25) foram considerados citotóxicos, pois resultaram em viabilidade celular inferior a 70%, quando avaliados na concentração de 90 µg/mL no ensaio com MTT (Figura 17). Por outro lado, nenhum dos 37 extratos avaliados resultou em viabilidade celular <80% na concentração de 30 µg/mL, confirmando a ausência de citotoxicidade nessa concentração.

Já no ensaio utilizando a LDH (Figura 18), os extratos de *B. altimontana* (5), *B. calvescens* (8), *B. dracunculifolia* (9), *B. hemiptera* (10), *B. myriocephala* (14), *B. opuntioides* (15), *B. retusa* (19), *S. lymansmithii* (22) não foram citotóxicos na concentração de 90 µg/mL, pois não houve aumento significativo da liberação da enzima LDH (Figura 18).

O MTT é um sal tetrazólico adequado para verificar célula viável metabolicamente e, portanto, usado para medir citotoxicidade. Desidrogenases mitocondriais presentes em células metabolicamente viáveis reduzem o anel tetrazólico do MTT (amarelo) em cristais de formazana (roxo); estes são insolúveis em água, mas solubilizam-se em DMSO. As vantagens deste ensaio colorimétrico são sua rapidez, simples execução, sensibilidade e precisão (MOSMANN, 1983). O método do MTT é um dos mais utilizados para avaliação da viabilidade em diferentes linhagens de células tais como Vero, A549 e Huh7, entre outras (CLAIN et al., 2018; CLAIN et al., 2019; FERREIRA et al., 2019; HADDAD et al., 2019a). Porém, uma limitação do método é que para avaliação de extratos de plantas ou substâncias com potencial redutor intrínseco este ensaio pode gerar resultados falsos positivos e a coloração dos extratos que pode interferir na leitura, por isso, estes devem ser avaliados com precaução. Por exemplo, extratos de *Hypericum perforatum* e *Cimicifuga racemosa*, as substâncias resveratrol e canferol, e antioxidantes como ácido ascórbico, vitamina E e N-acetilcisteína reduziram o MTT em cristais de formazana, mesmo na ausência de células (BRUGGISSER et al., 2002). Dessa forma, no presente trabalho foi empregado o método de LDH para confirmar os resultados obtidos no ensaio com o MTT e eliminar eventuais resultados falsos.

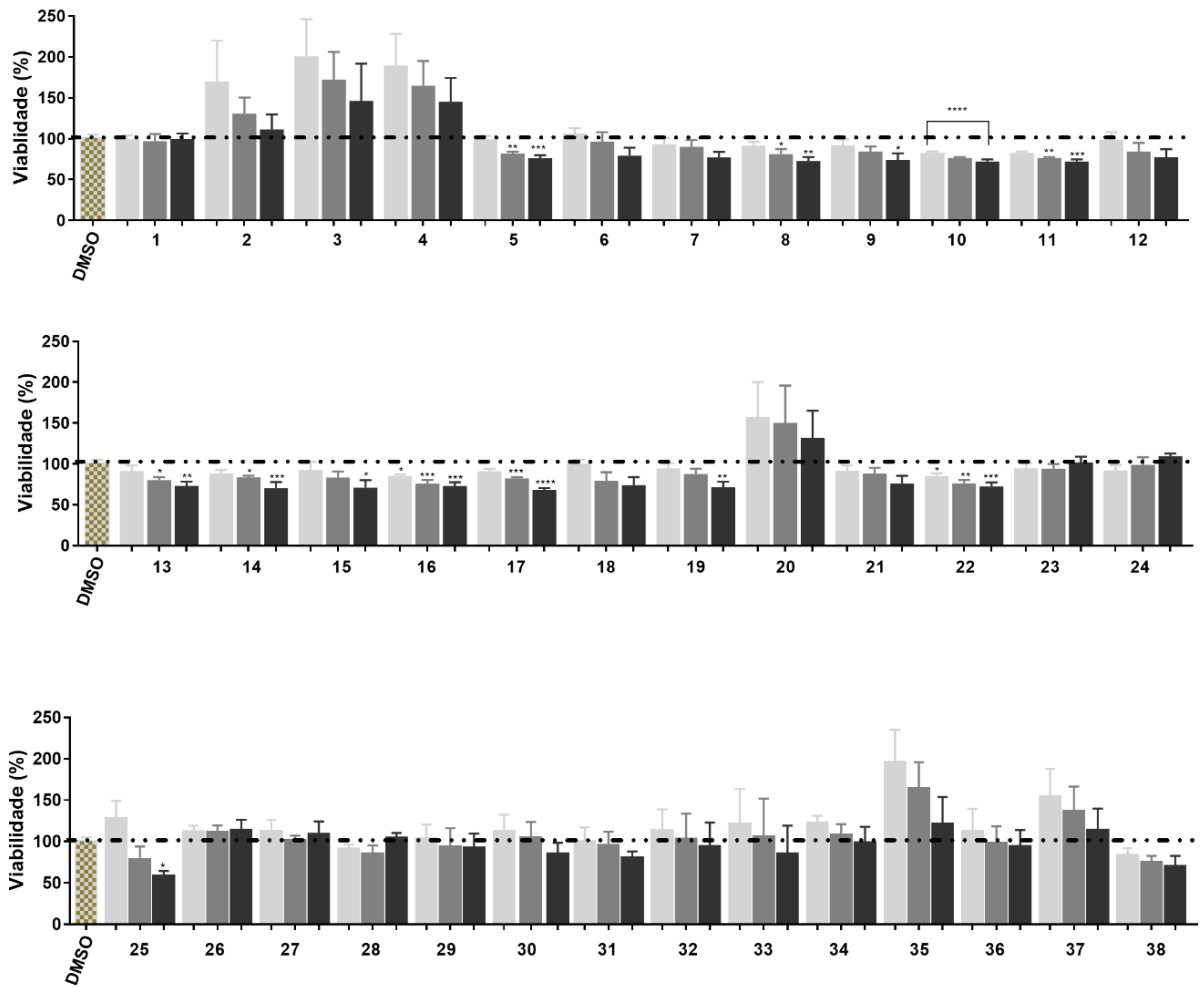


Figura 17. Citotoxicidade dos extratos em células Vero CCL-81, avaliados pelo método do MTT.

Vide tabela 1 da seção experimental (item 4.8) para identificação dos extratos. A amostra 38 é uma mistura de friedelina e friedelinol (M1). Os extratos foram avaliados a 10 µg/mL (barras cinza claro), 30 µg/mL (barras cinza médio) e 90 µg/mL (barras pretas). DMSO foi empregado como controle negativo. As barras representam valores médios ± erro padrão da média (SEM), onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo controle de células. Linha tracejada = controle de células, sem extrato.

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citoplasmática estável, encontrada em todas as células. Ela é liberada no sobrenadante da cultura celular quando a membrana plasmática é danificada durante os processos de apoptose, necrose, ou outras formas de dano celular (KUMAR et al., 2018). Portanto, a LDH pode ser usada para avaliação da citotoxicidade. A atividade da LDH pode ser facilmente quantificada, visto que é uma enzima oxido-redutase (reduz o NAD para NADH), que catalisa a conversão de piruvato em lactato. A quantificação da LDH também é um método rápido, confiável, e de simples execução (DECKER e LOHMANN-MATTHES, 1988).

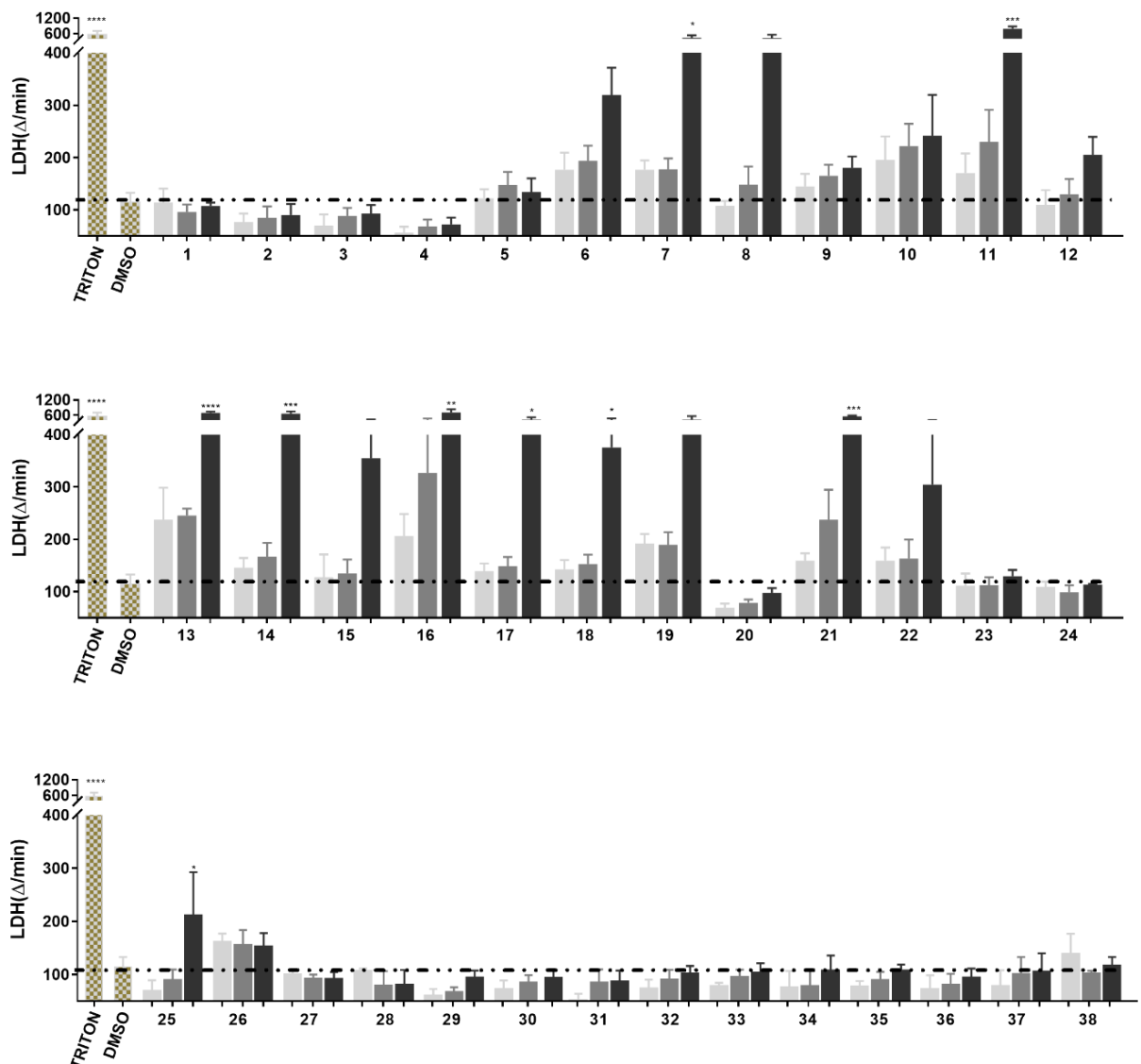


Figura 18. Citotoxicidade dos extratos avaliados em células Vero CCL-81, avaliados pelo método do LDH.

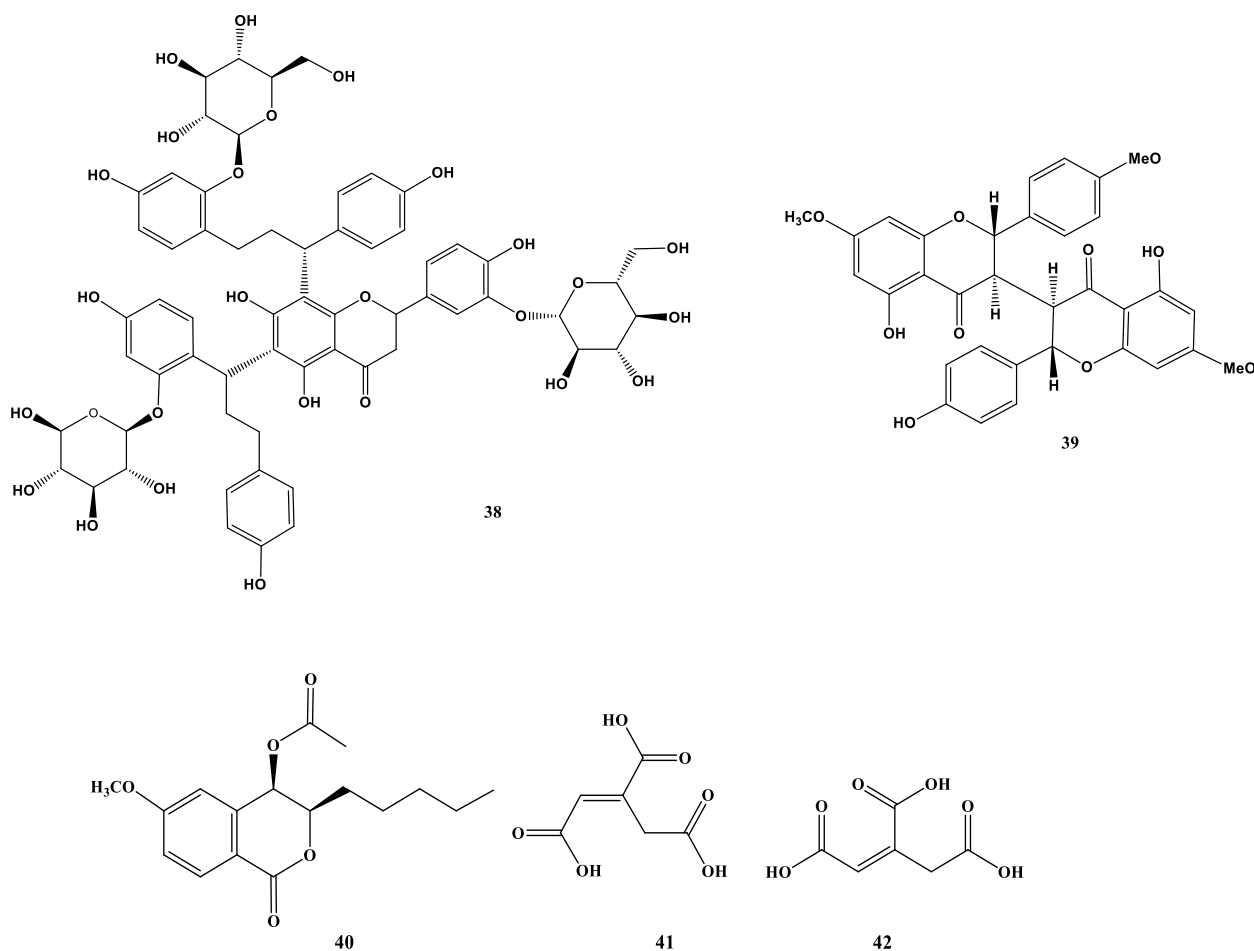
Vide tabela 1 da seção experimental (item 4.8) para identificação dos extratos. A amostra 38 é uma mistura de friedelina e friedelinol (M1). Os extratos foram testados nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (barras cinza-claras), 30 $\mu\text{g/mL}$ (barras cinza médias) e 90 $\mu\text{g/mL}$ (barras pretas). Triton foi usado como controle positivo e DMSO como controle negativo. As barras representam valores médios \pm SEM, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo de controle de células. Linha tracejada = controle de células, sem extrato.

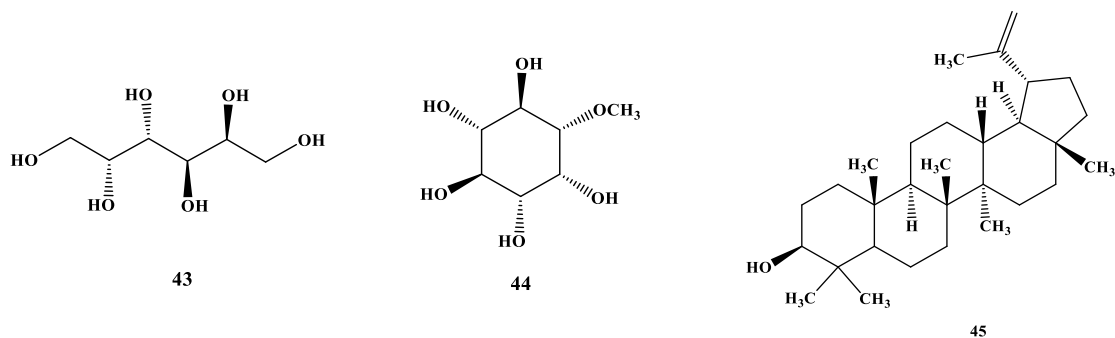
Fotakis e Timbrell (2006) realizaram um estudo comparativo *in vitro* entre os métodos do MTT e LDH e relataram que o ensaio utilizando o MTT é mais sensível que o LDH para detecção de eventos citotóxicos precoces. Isto poderia explicar a detecção da citotoxicidade em um maior número de extratos aqui observada para o MTT. De maneira geral, os dados obtidos também indicam a correspondência entre os resultados dos dois métodos. As plantas que apresentaram citotoxicidade em ambos os métodos pertencem ao gênero *Baccharis*, além da espécie *Maytenus ilicifolia*. Segundo Verdi e colaboradores (2005), cerca de 30 espécies de

Baccharis apresentaram várias atividades biológicas, incluindo efeitos citotóxicos, o que explicaria os resultados observados. Por sua vez, constituintes de *M. ilicifolia* da classe dos triterpenos raramente encontrados nas folhas, a saber, pristimerina, tingenona, 3-metil-6-oxotingenol e 22-β-hidroxitingenona, apresentaram citotoxicidade moderada em linhagens de células tumorais (SHIROTA et al., 1994; COSTA et al., 2008), o que talvez justificaria a citotoxicidade aqui relatada.

Do total de 37 amostras testadas, 13 extratos apresentaram efeito citotóxico (viabilidade inferior a 70%) na maior concentração ensaiada, ou seja, 35% dos extratos avaliados foram citotóxicos.

As substâncias selecionadas mansoína A (*Mansoa hirsuta*) (**38**), ourateína D (*Ouratea spectabilis*) (**39**), diidroisocumarina (*Xyris pterygoblephara*) (**40**), ácido *trans*-aconítico (*Echinodorus grandiflorus*) (**41**), ácido *cis*-aconítico (*Echinodorus grandiflorus*) (**42**), dulcitol (*Maytenus acanthophylla*) (**43**), bornesitol (*Hancornia speciosa*) (**44**) e lupeol (*Maytenus acanthophylla*) (**45**) foram avaliadas nas concentrações de 1, 3 e 10 μM.





Tanto no método do MTT (Figura 19A) como no do LDH (Figura 19B), mansoína A (C1), diidroisocumarina (C3), ácido *cis*-aconítico (C5), dulcitol (C7) e bornesitol (C8) não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. No entanto, ourateína D (C2), ácido *trans*-aconítico (C4) e lupeol (C6) foram citotóxicos na concentração de 10 μM , reduzindo a viabilidade celular para 73% (Figura 19A).

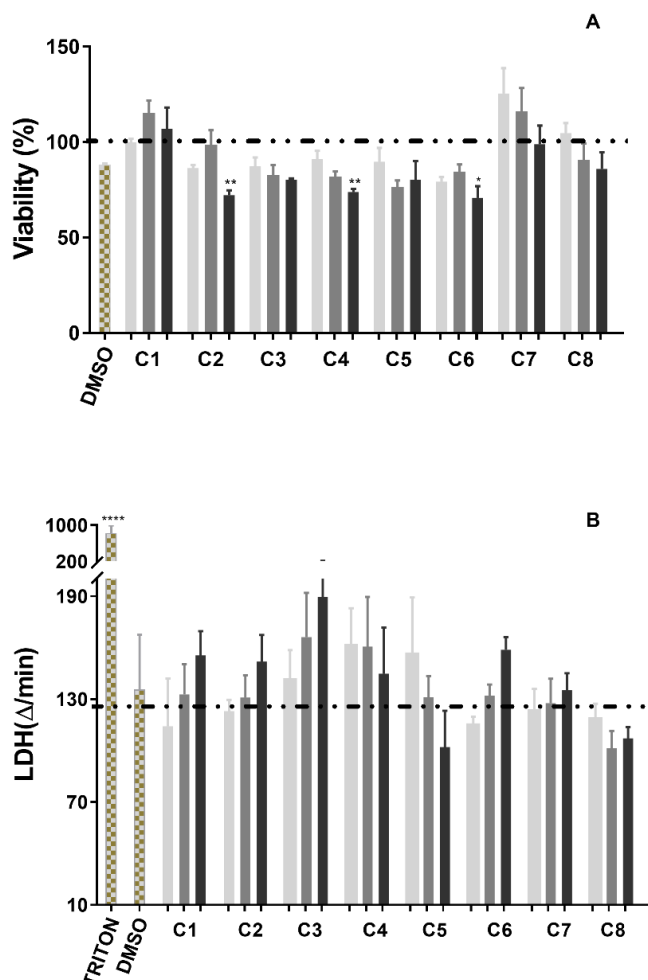


Figura 19. Citotoxicidade das substâncias avaliadas em células Vero CCL-81, utilizando os métodos do MTT (A) e do LDH (B).

Mansoína A (C1), ourateína D (C2), diidroisocumarina (C3), ácido *trans*-aconítico (C4), ácido *cis*-aconítico (C5), lupeol (C6), dulcitol (C7) e L-(+)-bornesitol (C8). As substâncias foram ensaiadas a 1 μM (barras cinza-claras), 3 μM (barras cinza-médias) e 10 μM (barras pretas). Triton foi usado como controle positivo e DMSO como controle negativo. As barras representam valores médios \pm SEM. Linha tracejada = controle de células, sem extrato.

Na figura 17 observa-se que seis extratos apresentaram viabilidade celular superior a 100% no ensaio do MTT, respectivamente *O. castaneifolia* folhas (OCF), *O. spectabilis* folhas (OSF), *H. speciosa* folhas (HSF), *H. speciosa* extrato padronizado (HSP), *B. serrulata* partes aéreas (BSPA) e *M. ilicifolia* (MI). Esses resultados provavelmente se devem à interferência de alguns compostos fenólicos capazes de reduzir o MTT em cristais de formazana por uma reação química independente da célula (BRUGGISSER et al., 2002). Diante disso, um método alternativo foi empregado para avaliar a citotoxicidade desses extratos. O método utilizado foi o da sulforrodamina B (SRB). Este baseia-se na capacidade do corante SRB, em meio levemente ácido, de se ligar eletrostaticamente a resíduos de aminoácidos básicos de proteínas das células fixadas em ácido tricloroacético. Este é um ensaio colorimétrico não destrutivo, estável e sensível para medir citotoxicidade, além de ser de baixo custo (VOIGT, 2005). Uma limitação do ensaio de SRB, quando comparado ao ensaio de MTT, é o longo tempo requerido para sua execução, que totaliza cinco dias. Por isso ele não foi escolhido como método inicial para avaliação da citotoxicidade dos extratos no presente estudo.

Os resultados obtidos no ensaio de SRB para os extratos de *O. castaneifolia*, *O. spectabilis*, *H. speciosa*, *B. serrulata* e *M. ilicifolia* (Figura 20) indicaram que eles não são citotóxicos nas mesmas concentrações avaliadas anteriormente pelo ensaio do MTT. Todos eles apresentaram viabilidade celular superior a 80%.

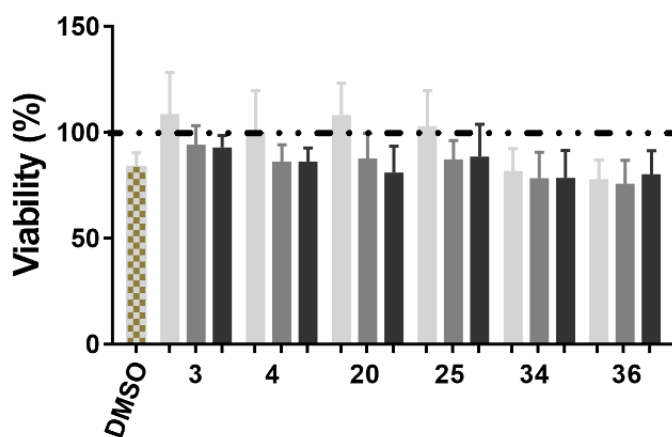


Figura 20. Citotoxicidade de cinco extratos vegetais avaliados em células Vero CCL-81 pelo método da SRB.

Vide tabela 1 da seção experimental (item 4.8) para identificação dos extratos. Os extratos foram ensaiados a 10 µg/mL (barras cinza-claras), 30 µg/mL (barras cinza-médias) e 90 µg/mL (barras pretas). DMSO foi empregado como controle negativo. As barras representam valores médios ± SEM. Linha tracejada = controle de células, sem extrato.

Diante das limitações do ensaio de MTT e LDH foi observada a importância de se utilizar mais de um método para avaliação da citotoxicidade de extratos vegetais. Os métodos a serem selecionados devem ter mecanismos que utilizam vias diferentes na detecção de um dano celular.

5.3 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

Uma vez determinado que os extratos selecionados para estudo não apresentam citotoxicidade para as células Vero CCL-81 nas concentrações de 10 e 30 µg/mL, eles tiveram sua atividade antiviral avaliada *in vitro* frente ao ZIKV. De maneira semelhante, as substâncias inicialmente selecionadas para teste foram avaliadas em concentrações não tóxicas. A seguir são descritos os resultados da padronização do ensaio, bem como os resultados da triagem antiviral dos extratos.

5.3.1 Padronização das condições experimentais do ensaio para detecção de atividade antiviral

Para avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos inicialmente foi preparada a solução estoque do vírus. O ZIKV foi multiplicado em células C6/36 (*Aedes albopictus*) susceptíveis e permissivas ao vírus, e o título viral da solução, determinado pela equação (1) (item 4.10.3), foi igual a $1,0 \times 10^8$ UFP/mL. Baseado no título viral da solução estoque de ZIKV, determinou-se a multiplicidade de infecção (MOI), aqui mostrado no tempo de 48 h (tempo previamente padronizado no laboratório), a ser empregada nos ensaios de atividade antiviral. A viabilidade celular das células Vero CCL-81 infectadas pelo ZIKV em diferentes MOIs foi avaliada pelos métodos do MTT (Figura 21A) e LDH (Figura 21B). Observou-se diferença significativa na viabilidade celular após a infecção pelo ZIKV com a MOI de 0,3, 1 e 3, na presença de DMSO 0,3%, quando comparada ao controle de células. Já em relação à carga viral, não houve diferença estatística entre os grupos analisados separadamente, exceto para o ZIKV MOI 3 e o grupo ZIKV+DMSO MOI 3.

Para realizar os estudos de atividade antiviral com isolados clínicos de ZIKV é importante avaliar a cinética de infecção empregando diferentes MOIs (por exemplo, na faixa de 0,1 a 1) e diferentes tempos (por exemplo, 24, 48 e 72 h), a fim de selecionar as melhores condições para o ensaio (STROTTMANN et al., 2019). Os títulos de ZIKV podem ser determinados utilizando vários métodos descritos na literatura, o que dificulta a comparação dos títulos obtidos em diferentes ensaios. Outra limitação importante que dificulta a comparação dos dados obtidos foi descrita por Moser e colaboradores (2018). Os autores

demonstraram que a replicação do ZIKV é influenciada pelo número de passagens e pelo tipo de célula hospedeira (mamíferos ou mosquitos) empregada para produção do estoque viral. Dessa forma, diversas variáveis determinam o resultado final e devem ser consideradas.

Com base nos resultados representados na Figura 21C, a MOI de 1 (viabilidade superior a 75%) foi escolhida para os ensaios antivirais, visando utilizar menor quantidade de vírus e também possibilitar que as amostras ensaiadas fossem capazes de reverter a redução da viabilidade celular e demonstrar seu potencial efeito antiviral.

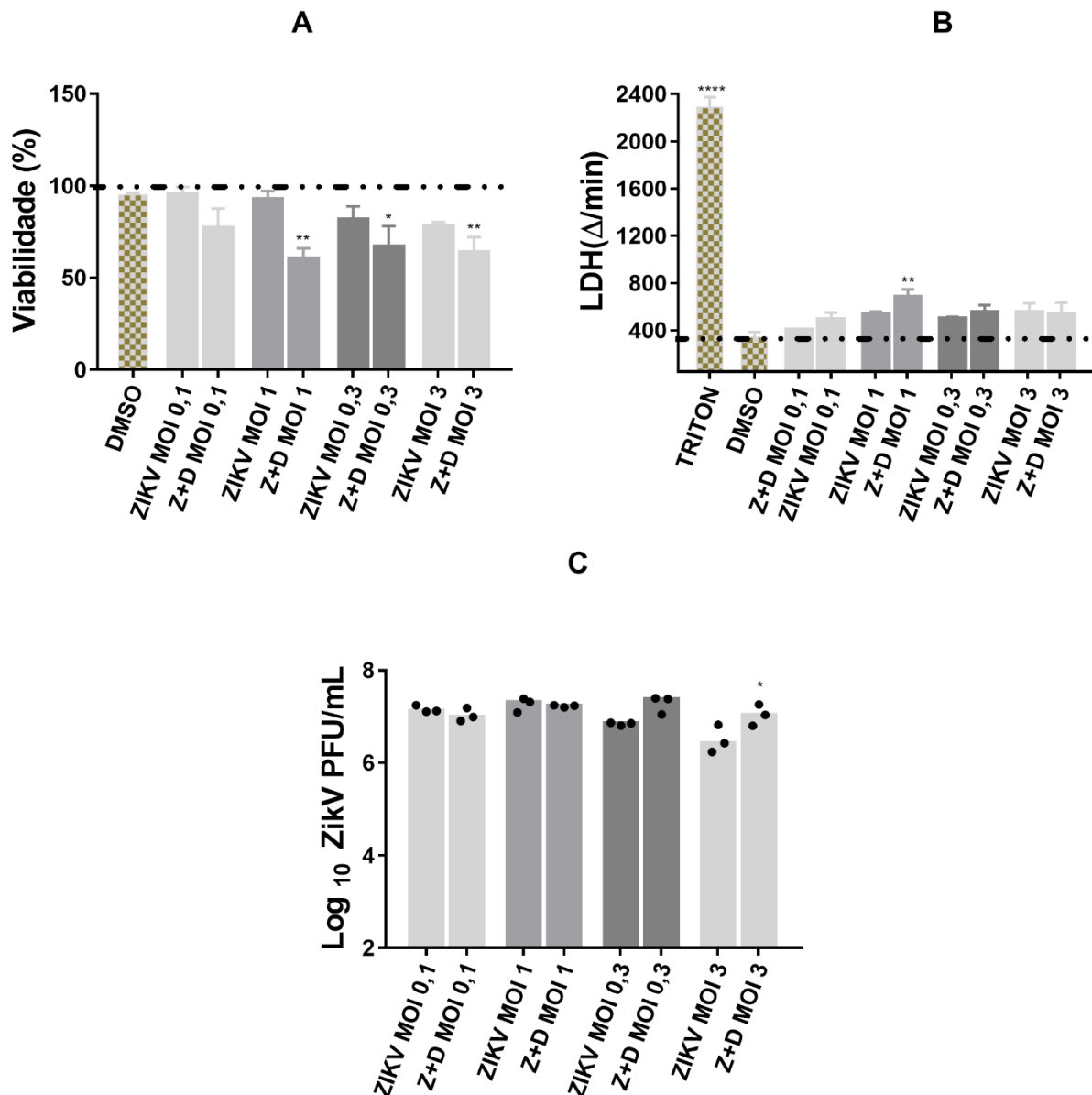


Figura 21. Padronização da MOI do ZIKV em células Vero CCL-81.

A viabilidade celular foi avaliada pelos métodos do MTT (A) e LDH (B). As barras representam valores médios \pm erro padrão da média (SEM), onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus grupo controle de células. A carga viral (C) foi determinada pelo teste de redução da placa de lise viral. No gráfico de carga viral, as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica, onde * $p < 0,05$ para ZIKV MOI 3 versus Z+D MOI 3. Linha tracejada = controle de células, sem ZIKV. Z+D = ZIKV+DMSO.

5.3.2 Atividade dos extratos e substâncias frente ao ZIKV em células Vero CCL-81

A atividade antiviral dos extratos, das substâncias selecionadas e de uma mistura de triterpenos foi avaliada inicialmente em células Vero CCL-81, pelo ensaio de formação de placas de lise. No presente estudo o AH-D foi utilizado como controle positivo. Tendo em vista os resultados de citotoxicidade, a concentração de 90 µg/mL não foi avaliada, já que ela foi citotóxica para algumas amostras. Dessa forma, 37 extratos vegetais foram avaliados no ensaio de atividade antiviral frente ao ZIKV nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/mL. Adicionalmente, avaliou-se uma mistura de triterpenos (friedelina+friedelinol) nas mesmas concentrações.

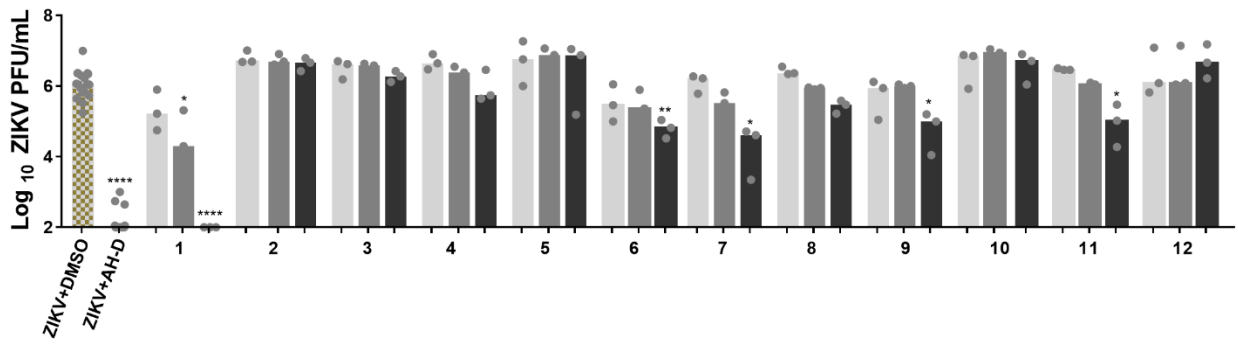
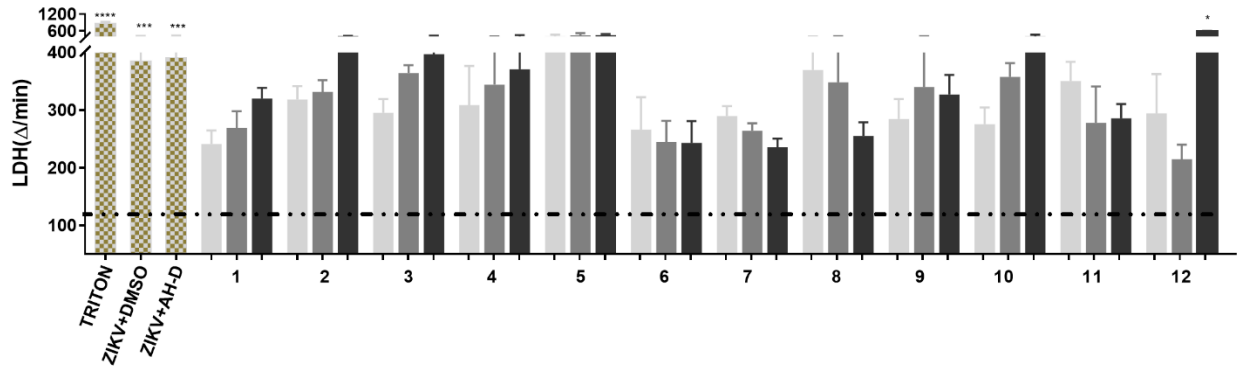
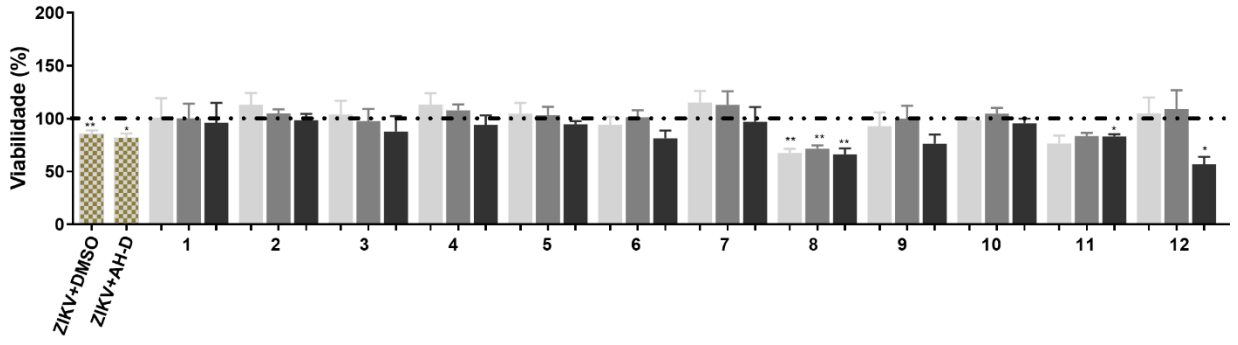


Figura 22. Continuação

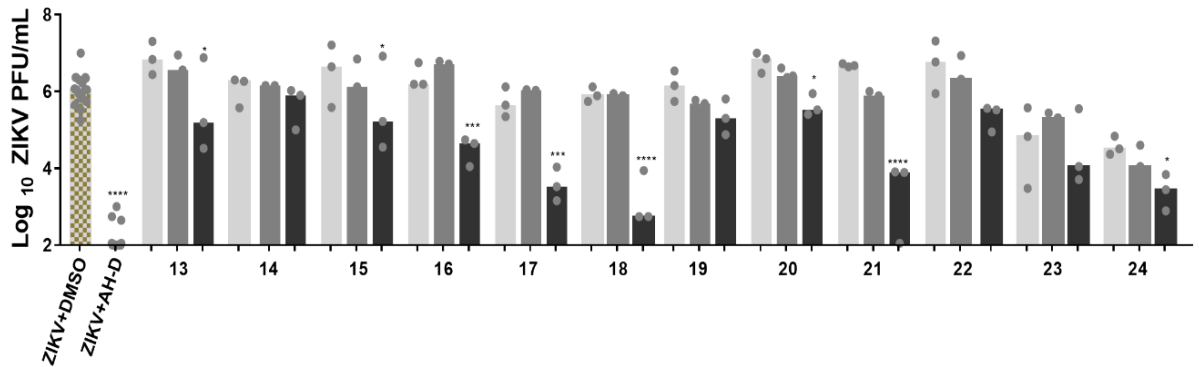
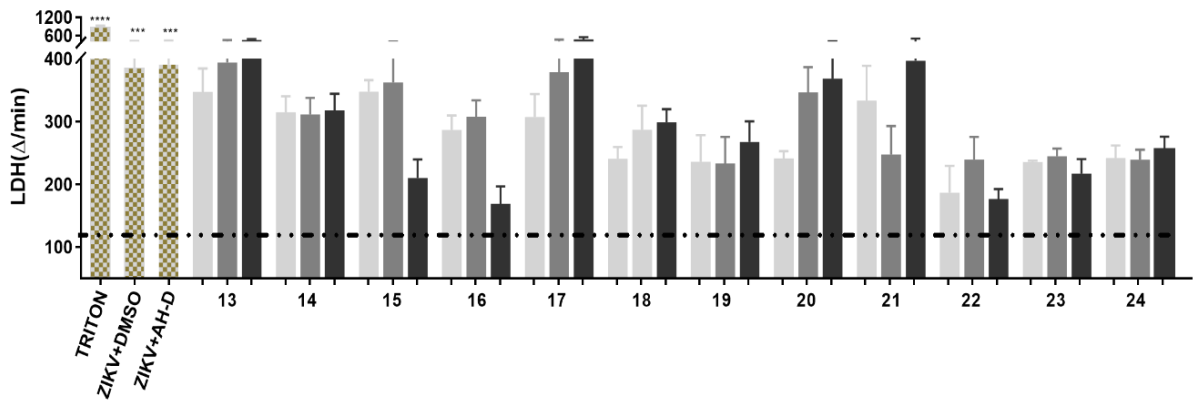
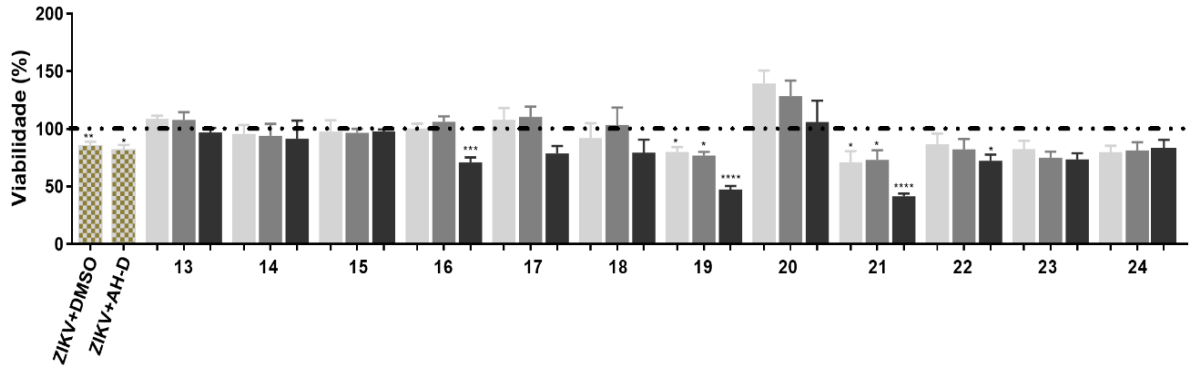


Figura 22. Continuação

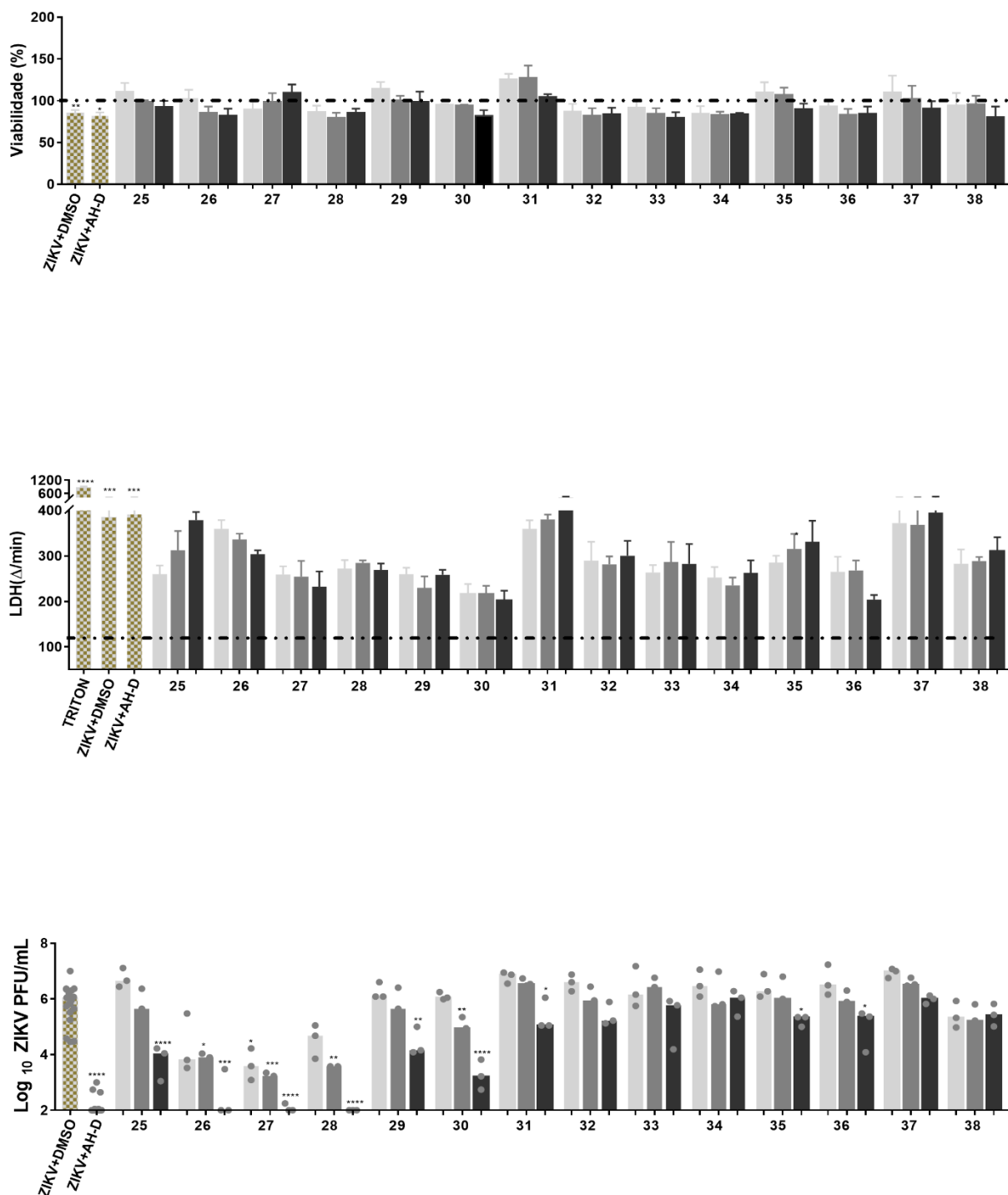


Figura 22. Efeito de extratos e de mistura de triterpenos sobre a viabilidade celular pelos métodos do MTT e LDH e determinação da carga viral em células Vero CCL-81 infectadas por ZIKV.

Vide Tabela 1 para identificação dos extratos. A amostra 38 é uma mistura de friedelina e friedelinol (M1). Os extratos e M1 foram testados a 3 $\mu\text{g/mL}$ (barras cinza-claras), 10 $\mu\text{g/mL}$ (barras cinza-médias) e 30 $\mu\text{g/mL}$ (barras pretas). Para o MTT e LDH, as barras representam valores médios \pm SEM, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo de controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Na determinação da carga viral as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey (ZIKV+tratado versus ZIKV+DMSO), onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. AH-D foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem extrato e ZIKV.

Os resultados dispostos na Figura 22 possibilitaram identificar 13 extratos ativos: *E. grandiflorus* (3,8 log de inibição da carga viral) (1), *B. calvescens* (2,0 log) (7), *B. imbricata* (1,0 log) (11), *B. magnifica* (0,4 log) (13), *B. opuntioides* (0,4 log) (15), *M. acanthophylla* (1,1 log) (24), *M. ilicifolia* ((2,4 log, extrato diclorometânico (25); 2,0 log, extrato metanólico (26)), *M. rigida* (2,4 log) (27), *M. truncata* (2,5 log) (28), *T. phaeocarpa* (1,8 log) (29), *T. glabrescens* (2,6 log) (30) e *O. spectabilis* (1,1 log) (36). Esses extratos reduziram a carga viral de maneira dependente da concentração e não reduziram a viabilidade celular das células infectadas e tratadas, quando comparado ao grupo controle (ZIKV+DMSO). Portanto, esses extratos apresentaram efeito antiviral, pois a carga viral de ZIKV recuperada foi reduzida quando comparado ao grupo controle (ZIKV+DMSO).

Treze extratos foram ativos nesta triagem antiviral em células Vero CCL-81, do total de 37 extratos testados, ou seja, aproximadamente 35% do total foram ativos frente ao ZIKV. No estudo de Barbosa e colaboradores (2022), a triagem de 1000 extratos etanólicos de plantas frente ao ZIKV resultou em 2,1% (total de 21) de extratos ativos. Além disso, pode-se avaliar a taxa de extratos ativos em triagens realizadas frente a outros vírus. No estudo de Fortin e colaboradores (2002), a triagem de 36 extratos metanólicos de plantas medicinais frente aos vírus do herpes simples tipo I e poliovírus tipo 2 resultou em 13% de extratos ativos. Betancur-Galvis e colaboradores (2002), numa triagem de 47 extratos vegetais frente ao vírus do herpes simples tipo 2, relataram 11% de extratos ativos. Em ambos os estudos foram adotados, como critério de seleção das espécies, a abordagem etnofarmacológica. No presente estudo foram identificados 35% de extratos ativos, um percentual expressivo quando comparando com outros trabalhos da literatura, e que demonstra a validade da abordagem quimiosistemática para a triagem de extratos frente ao ZIKV. É importante destacar, ainda, que não há relatos na literatura sobre a atividade antiviral das espécies aqui identificadas como ativas frente ao ZIKV ou a outros vírus.

A revisão bibliográfica realizada indicou atividade antiviral frente a outros vírus relatada para espécies dos mesmos gêneros das espécies ativas aqui identificadas, ou contendo constituintes das mesmas. Flavonoides (rutina, isoorientina, vitexina, isovitexina, apigenina 8-C-(2''-galoil)- β -D-glicosídeo, apigenina 6-C-(2''-galoil)- β -D-glicosídeo), antocianinas (cianidina e procianidina), compostos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico) e taninos hidrolisáveis (ácido chebulágico, ácido chebulínico, corilagina, punicalina e punicaligina) foram isolados do extrato hidroalcoólico de folhas de *Terminalia catappa* e apresentaram atividade anti-HIV *in vitro* (DWEVEDI et al., 2016). O extrato aquoso de folhas de *Terminalia chebula* exibiu atividades anti-HBV (vírus da hepatite B) em células HepG2 (KIM et al., 2001).

Casuarinina, um tanino hidrolisável isolado da casca de *Terminalia arjuna*, foi ativo frente ao vírus do herpes simples tipo 2, em células Vero (CHENG et al., 2002).

Estudos *in vitro* relatam que triterpenos pentacíclicos isolados do extrato em clorofórmio da casca de *Maytenus macrocarpa* apresentaram atividade anti-HIV em células TC8166 (MALANÍK et al., 2019). Para *Maytenus ilicifolia*, o estudo antiviral *in vitro* relatado envolveu o uso de vírus que não infecta humanos. O extrato etanólico das folhas de *M. ilicifolia* inibiu a replicação do vírus do herpes bovino tipo 5 em células L929, CRIB, CER e CRFK (KOHN et al., 2012). A pristimerina é um triterpeno identificado em algumas espécies de *Maytenus* selecionadas para estudo no presente trabalho (Tabela 11). A pristimerina foi ativa frente ao citomegalovírus humano, inibindo a replicação viral com IS = 27,9, avaliado em células MRC-5 (MURAYAMA et al., 2007).

Os biflavonoides agatisflavona e 7'-metil-agatisflavona, isolados de folhas de *Ouratea parviflora*, apresentaram efeito antiviral frente ao vírus do herpes simples tipo 1, em células Vero (ARAÚJO et al., 2011). Uma fração rica em compostos fenólicos das partes aéreas de *Baccharis anomala* apresentou atividade antiviral frente ao vírus do herpes simples tipo 1, em células Vero (VENTURI et al., 2018). Os extratos aquosos e etanólicos de *Baccharis erioclada*, *Baccharis megapotamica*, *Baccharis uncinella* e *Maytenus ilicifolia* exibiram atividade antiviral frente ao vírus do herpes simples tipo 1, em células Vero (MONTANHA et al., 2004).

Algumas espécies vegetais já foram descritas com atividade frente ao ZIKV. Assim, o extrato hexânico de folhas e galhos de *Tontelea micranta* apresentou atividade anti-ZIKV na concentração de 15,6 µg/mL, em células Vero. Desse extrato foram isolados friedelan-1,3,21-triona, friedelan-3-ona, 3β-friedelinol, ácido 3,4-seco-friedelan-3-oico, 28-hidroxifriedelan-3-ona, friedelan-3-oxo-28-ol, friedelan-3,21-diona, 30-hidroxifriedelan-3-ona, uma mistura de 30-hidroxifriedelan-3-ona/21α-hidroxifriedelan-3-ona, 21β-hidroxifriedelan-3-ona, esqualeno, e uma mistura de ácido palmítico/esteárico/oléico (FERREIRA, et al., 2019). Além disso, os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico de folhas e galhos de *T. micranta* apresentaram atividade frente ao vírus Mayaro, com IS entre 1,2 a 3,6 (CRUZ et al., 2018).

Neste contexto, é factível supor que a atividade aqui relatada para espécies de *Maytenus* (*M. rigida*, *M. truncata* e *M. ilicifolia*) deva-se principalmente aos triterpenos já relatados para o gênero. Também é provável a existência de sinergismo dos triterpenos com outros constituintes dos extratos, visto que a mistura de triterpenos avaliada no presente trabalho não apresentou efeito anti-ZIKV.

Em estudo recente, o extrato aquoso das partes aéreas de *Aphloia theiformis* apresentou atividade antiviral frente ao ZIKV e não foi citotóxico (CC₅₀=3000 µg/mL) para células Vero.

O efeito concentração dependente de *A. theiformis* foi observado com redução de 2 log de carga viral recuperada do ZIKV quando comparado ao inóculo viral, com CI_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 30 (CLAIN et al., 2018). Já o extrato etanólico de frutos de *Schinus terebinthifolius* apresentou atividade anti-ZIKV na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, com redução da carga viral, determinada por RT-PCRq e citometria de fluxo (OLIVEIRA et al., 2020).

O extrato aquoso de partes aéreas de *Psiloxylon mauritianum*, testado na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, inibiu a infecção pelo ZIKV em células Vero, diminuindo em 2 log a produção de partículas virais infecciosas (CLAIN et al., 2019). Este extrato é rico em compostos fenólicos, tais como ácido gálico, quercetina e canferol. O extrato de *P. mauritianum* também foi ativo frente ao DENV (CLAIN et al., 2019). Alguns dos constituintes do extrato etanólico de folhas de *Ocimum basilicum* foram testados individualmente ou em mistura frente ao ZIKV, a saber, (*R*)-(-)-carvona, (*S*)-(+)-carvona, *trans*-geraniol, apigenina, linalol e ácido ursólico, e os resultados revelaram que esses componentes não têm eficácia contra o ZIKV (SINGH et al., 2019).

Silva e colaboradores (2019) relataram que o extrato hexânico de caule de *Himatanthus bracteatus* não apresentou atividade antiviral frente ao ZIKV, YFV e DENV-2 e apresentou atividade citotóxica moderada ($CC_{50} = 50,36 \pm 1,49 \mu\text{g/mL}$) em células Vero. Já o extrato etanólico de *H. bracteatus* apresentou baixa citotoxicidade ($CC_{50} = 348,02 \pm 5,75 \mu\text{g/mL}$) e atividade significativa contra o ZIKV, YFV e DENV-2 (valores de CI_{50} de $31,46 \pm 0,72$; $17,43 \pm 3,90$ e $25,03 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) com IS > 10. A plumierida, um glicosídeo de sesquiterpeno, constituinte majoritário de *H. bracteatus*, foi ativo frente o ZIKV ($CI_{50} = 14,49 \pm 0,72 \mu\text{g/mL}$ e IS = 15,97) (SILVA et al., 2019).

De acordo com Vista e colaboradores (2020), extratos aquosos de folhas de *Momordica charantia*, *Psidium guajava*, *Vitex negundo* e *Blumea balsamifera*, ricos em saponinas, terpenos, terpenóides e antocianinas apresentaram atividade anti-ZIKV, sendo o melhor efeito antiviral observado para o extrato de *P. guajava* ($CI_{50} = 0,1575 \text{ mg/mL}$), com índice de seletividade < 1,6. Os constituintes químicos desses extratos foram identificados em análises por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, a saber, saikosaponina D, esculentosídeo B, ácido ganodérico Y, euscafato de metila, cimisédeo F, esculentosídeo A, ácido pomólico e ácido ganodérico U para *M. charantia*; benzoilpaeniflorina para *P. guajava*; crisantemina, ácido cimicifúgico B1, macrofilosídeo D, 5,7,2',5'-tetraidroxiflavona, mudanpiosídeo E, cimisédeo F, tinosídeo, diidrobrusatol 1, e andrografatosídeo para *V. negundo*; cianidina 3,5-diglicosídeo, retinol, bruceina F, delfinidina, schizonepetosídeo A,

arnicolídeo D, ácido 6,7-diidroartemísico, cilindreno, kirenol, e nigakilactona K para *B. balsamifera*. Esses constituintes foram avaliados em estudo *in silico* de ancoragem molecular, utilizando seis enzimas: ZIKV helicase, ZIKV protease, ZIKV metiltransferase, RNA polimerase dependente de RNA, proteína E (envelope) e proteína AXL humana, que tem funções relacionadas com a adsorção, infecção e replicação do ZIKV nas células hospedeiras. Os resultados mostraram uma maior afinidade de ligação às proteínas de replicação viral em comparação com a proteína do envelope viral (processo de entrada e infecção viral) (VISTA et al., 2020).

O extrato de partes aéreas de *Doratoxylon apetalum* inibiu eficientemente a infecção pelo ZIKV em células A549 de maneira concentração dependente e, quando ensaiado a 100 µg/mL, reduziu em 5 log a progênie viral (HADDAD et al., 2019a). O óleo essencial de partes aéreas de *Ayapana triplinervis* não foi citotóxico em células A549 e apresentou atividade anti-ZIKV com CI_{50} de 38 µg/mL e IS = 12,5. O éter dimetil-timo-hidroquinona, isolado do óleo essencial de *A. triplinervis*, também apresentou atividade antiviral frente ao ZIKV com CI_{50} de 45 µg/mL e IS = 9,1 (HADDAD et al., 2019b).

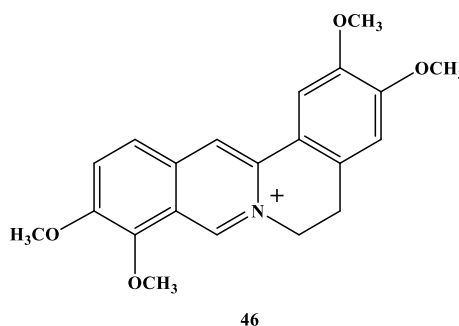
Segundo Haddad e colaboradores (2020), o extrato em etanol/água (70:30) de folhas de *Phyllanthus phillyreifolius* apresentou atividade antiviral frente ao ZIKV com CI_{50} = 55 µg/mL e IS = 13 em células A549, reduzindo em 3 log a produção da progênie viral quando avaliado na concentração de 250 µg/mL. Esse mesmo extrato apresentou atividade anti-DENV em células Huh7.5. O extrato etanólico de *P. phillyreifolius* possui como constituinte majoritário a geraniina, seguido por ácido elágico, elaeocarpusina, rutina, quercetina e ácido gálico. A geraniina apresentou atividade anti-ZIKV (CI_{50} = 22 µg/mL, IS = 19) em células A549 (HADDAD et al., 2020).

Sze e colaboradores (2017) relataram o isolamento de soforaflavanona G do extrato etanólico de raízes de *Sophora flavescens*. Esta substância inibiu a replicação do vírus da hepatite C (HCV), de maneira concentração dependente, reduzindo em mais de 80% o mRNA do HCV em células Huh7.5, avaliado por qRT-PCR. A soforaflavanona G também foi ativa contra os vírus da Dengue (CI_{50} = 14,5 µM) e Zika (CI_{50} = 22,6 µM) e o mecanismo de ação se dá por inibição da RNA polimerase viral (SZE et al., 2017).

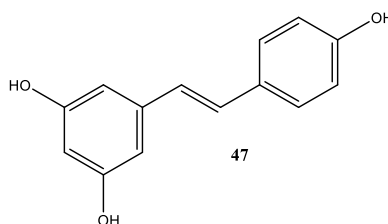
Além de extratos vegetais, a atividade anti-ZIKV de um extrato etanólico da alga marinha *Osmundaria obtusiloba* também foi relatada em células Vero (CIRNE-SANTOS et al., 2018). O extrato apresentou baixa citotoxicidade inibiu a replicação do ZIKV de maneira concentração dependente com valores de CI_{50} de 1,82 µg/mL e de IS de 288. O efeito do extrato

frente ao ZIKV aumentou significativamente com a adição de ribavirina, um antiviral sintético análogo da guanosina, e isso foi atribuído a um efeito sinérgico.

A atividade de alguns produtos naturais sobre o ZIKV também foi relatada. A palmatina (**46**) é um alcaloide encontrado nas espécies *Fibraurea recisa*, *Phellodendron amurense*, *Enantia chlorantha*, *Corydalis yanhusuo* e *Coptis chinensis*. Esse alcaloide também foi obtido por semissíntese a partir da tetraidropalmatina. A palmatina (**46**), avaliada na concentração de 80 mM, reduziu em 90% os níveis de RNA e da progênie viral do ZIKV em células Vero, avaliado por qRT-PCR. Seu mecanismo de ação antiviral foi estudado detalhadamente e consiste na interrupção de processos de adsorção e entrada do ZIKV nas células Vero, além de interferir na estabilidade das proteínas de envelope do ZIKV (HO et al., 2019).



O resveratrol (**47**), um estilbenoide encontrado principalmente em uvas e amendoim, apresentou atividade anti-ZIKV na concentração de 80 μM , reduzindo $> 90\%$ o título viral e o número de cópias de mRNA em células Huh7, de maneira concentração dependente, sendo sua atividade antiviral determinada com base na redução de placas de lise e qRT-PCR, respectivamente. Estudos de mecanismo de ação demonstraram que o resveratrol apresentou efeito virucida, além de interferir na ligação do vírus às células Huh7 (MOHD et al., 2019).



A curcumina (**24**), um pigmento natural encontrado no açafrão, apresentou atividade antiviral *in vitro* concentração dependente (1 a 5 μM) frente aos vírus Zika e Chikungunya em células HeLa e BHK-21. A concentração de 5 μM foi a mais efetiva em reduzir as partículas virais, sem afetar a viabilidade celular. A curcumina ($\text{CC}_{50} = 11,6 \mu\text{M}$ e $\text{CI}_{50} = 1,90 \mu\text{M}$) e seus análogos bisdimetoxi-curcumina ($\text{CC}_{50} = 16,0 \mu\text{M}$ e $\text{CI}_{50} = 3,61 \mu\text{M}$) e dimetoxi-curcumina ($\text{CC}_{50} = 13,2 \mu\text{M}$ e $\text{CI}_{50} = 5,91 \mu\text{M}$) apresentaram atividade anti-ZIKV (MOUNCE et al., 2017).

A quercetina é um flavonoide de ampla distribuição, cuja ocorrência já foi relatada para algumas das espécies em estudo (Tabela 11). Segundo Wong e colaboradores (2017), um derivado da quercetina, quercetina-3- β -O-D-glicosídeo (**35**), exerceu atividade antiviral frente ao ZIKV em cultura de células Vero e *in vivo* em camundongos *knockout* infectados por ZIKV. A quercetina-3- β -O-D-glicosídeo (**35**) também apresentou atividade antiviral frente ao ZIKV em células A549, Huh-7 e SH-SY5Y (GAUDRY et al., 2018). Entretanto, Gaudry e colaboradores (2018) relataram que quercetina, hiperosídeo e canferol não apresentaram efeito antiviral significativo contra a infecção pelo ZIKV, quando comparados à isoquercitrina.

A atividade anti-ZIKV de diversos polifenóis, além daqueles supracitados, está descrita na literatura, incluindo quercetina-3- β -O-D-glicosídeo, galato de epigallocatequina, delphinidina, curcumina e pinocembrina (WONG et al., 2017, GAUDRY et al., 2018, SHARMA et al., 2017, LIM et al., 2017; VÁZQUEZ-CALVO et al., 2017, MOUNCE et al., 2017, LEE et al., 2019). Esses dados ressaltam a importância da seleção das espécies baseada na abordagem quimiosistemática aqui utilizada, incluindo espécies ou gêneros que produzem polifenóis variados.

Especificamente, a espécie *T. phaeocarpa* avaliada no presente estudo, é endêmica no Brasil, e tradicionalmente utilizada como antidiabético e anti-inflamatório (BIESKI et al. 2012). Recentemente, utilizando UPLC-DAD-ESI-MS/MS, foi identificado 38 compostos fenólicos no extrato de etanólico de folhas de *T. phaeocarpa* (GOMES et al., 2021). Os constituintes identificados foram principalmente ácidos fenólicos, elagitanos e flavonóides, que são classes de substâncias amplamente distribuídos nas espécies do gênero *Terminalia*. Alguns deles, tais como os taninos hidrolisáveis casuarinina (de *Terminalia arjuna*) e ácido quebulágico, tiveram sua atividade antiviral relatada contra diferentes vírus (CHENG et al., 2002). Além disso, vários flavonoides e taninos hidrolisáveis isolados das folhas de *Terminalia catappa* (ácido quebulínico, cianidina, procianidina, apigenina 8-C-(2"-galoil)- β -D-glicosídeo, apigenina 6-C-(2"-galoil)- β -D-glicosídeo, punicalina e punicalagina) mostraram atividade anti-HIV (DWEVEDI et al., 2016). No presente estudo, o extrato etanólico de *T. phaeocarpa* apresentou atividade anti-ZIKV (1,8 log de redução), o qual é viável supor que os compostos polifenólicos encontrados no extrato de *T. phaeocarpa* sejam os responsáveis pela atividade.

Cabe destacar, ainda, a relevância do presente estudo, visto que o número de espécies vegetais avaliadas frente ao ZIKV é ainda limitado. O número reduzido de estudos pode estar relacionado ao fato do Zika ser um vírus emergente e, por isso, a busca por substâncias ativas é recente.

As substâncias isoladas mansoína A (C1), ourateína D (C2), diidroisocumarina (C3), ácido *trans*-aconítico (C4), ácido *cis*-aconítico (C5), lupeol (C6), dulcitol (C7) e bornesitol (C8), também foram avaliadas quanto à atividade antiviral frente ao ZIKV, nas concentrações de 1, 3 e 10 μ M. Não se observou atividade antiviral frente ao ZIKV para nenhuma das substâncias, visto que a carga viral do grupo tratado e infectado se manteve semelhante ao do grupo controle (ZIKV+DMSO) (Figura 23).

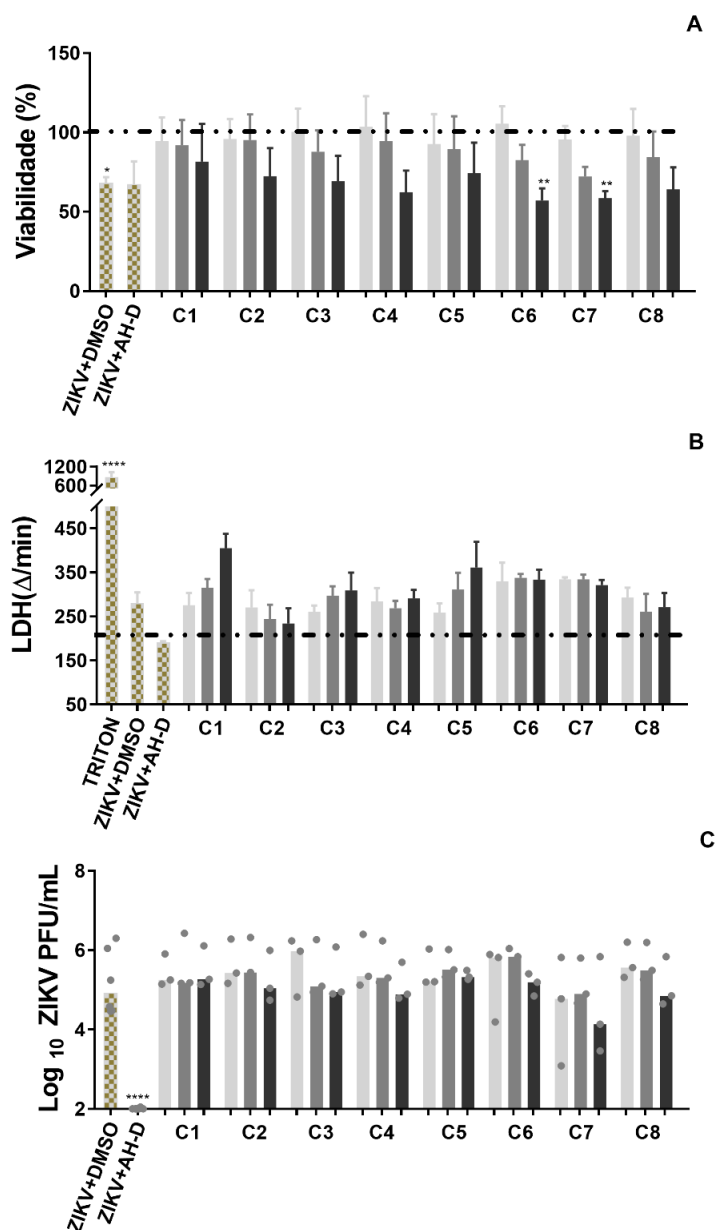
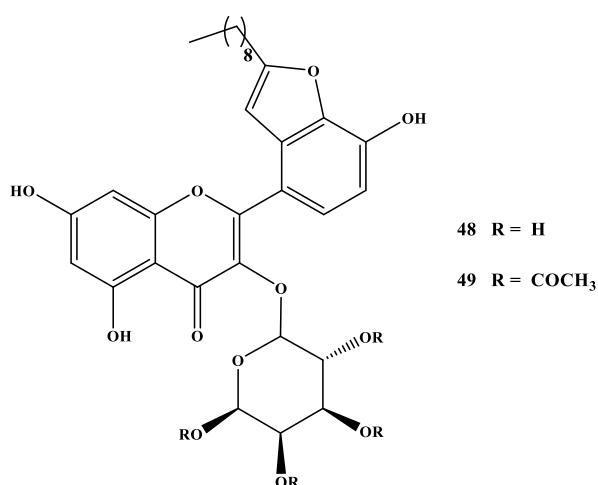


Figura 23. Efeito das substâncias testadas frente ao ZIKV avaliadas em células Vero CCL-81, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B) e determinação da carga viral (C).

Mansoína A (C1), ourateína D (C2), diidroisocumarina (C3), ácido *trans*-aconítico (C4), ácido *cis*-aconítico (C5), lupeol (C6), dulcitol (C7) e L-(+)-bornesitol (C8). Os compostos foram testados a 1 μ M (barras cinza-claras), 3 μ M (barras cinza-médias) e 10 μ M (barras pretas). Para o MTT e LDH, as barras representam valores médios \pm SEM, onde * p <0,05, ** p <0,01 e **** p <0,0001 *versus* grupo controle de células. A carga viral foi determinada pelo teste de redução da placa de lise viral e as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. AH-D foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem extrato e ZIKV.

Dentre os compostos avaliados, o lupeol (**45**) (triterpeno) (**C6**) foi anteriormente descrito como ativo *in vitro* frente ao DENV-2 em células LLC-MK₂, com CC₅₀ de 127,7 ± 21,4 µg/mL, CI₅₀ de 9,77 ± 0,90 µg/mL e IS de 13,07 (SILVA et al., 2017). Já em estudo *in vitro* realizado com células Vero, o lupeol apresentou-se ativo frente ao DENV-2, com CC₅₀ de 4015,5 µg/mL, CI₅₀ de 37,5 µg/mL e IS de 107,1 (GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017).

Mansoína A e ourateína D não foram ativos frente ao ZIKV, porém diversos polifenóis já foram descritos com atividade antiviral frente a outros vírus, conforme discutido anteriormente. Houttuinosídeo B (**48**) e tetra-acetil-houttuinosídeo B (**49**) são flavonoides glicosilados constituinte de *Houttuynia cordata*, também obtidos por síntese total (BÁSIC et al., 2019). Ambos não foram citotóxicos em células A549 (CC₅₀ de 6,3 µM e 42,5 µM, respectivamente), mas apenas o tetra-acetil-houttuinosídeo B apresentou atividade anti-ZIKV em dois isolados de ZIKV de Uganda e da Polinésia Francesa, com CI₅₀ de 1,675 µM e 1,552 µM, respectivamente. Seu mecanismo de ação se dá por interferência no processo de internalização da partícula viral nas células A4549 (BÁSIC et al., 2019).



Além de atividade contra o ZIKV, a atividade antiviral de polifenóis já foi descrita frente a vírus diversos. Dos extratos etanólicos de sementes de *Mammea americana* foram isolados cumarina A e cumarina B, as quais apresentaram atividade anti-DENV-2 com valores de CI₅₀ de 9,6 e 2,6 µg/mL, respectivamente, em células Vero, com índices de seletividade superiores a 100. Ambas cumarinas apresentaram atividade antiviral frente ao vírus Chikungunya em células Vero, com valores de CI₅₀ = 10,7 µg/mL e IS = 295,2 para cumarina A, e CI₅₀ = 0,5 µg/mL, IS = 1021,0 para cumarina B (GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017).

A genisteína é um isoflavonoide encontrado em várias plantas, incluindo soja e fava. Os coquetéis inibidores de tirosina-quinase contendo genisteína (100 µM), exibiram atividade

antiviral de amplo espectro contra os vírus Ebola, Marburg e Lassa em células Vero, sendo observada redução >90% da replicação viral, determinada por RT-PCR (KOLOKOLTSOV et al., 2012). O galato de epigalocatequina exibiu atividade antiviral frente o vírus da hepatite C, na concentração de 50 μM , diminuindo um log do título viral, com IS ~ 30 (CALLAND et al., 2011). O canferol e seus derivados acilados mostraram atividade inibitória contra o citomegalovírus humano com valores de CI_{50} entre 20 e 80 μM (MITROCOTSA et al., 2000). A apigenina, isolada do manjeriço (*Ocimum basilicum*), mostrou uma potente atividade antiviral *in vitro* contra adenovírus ($\text{CI}_{50} = 11,1 \mu\text{g/mL}$, IS = 5,4) e vírus do herpes simples tipo 2 ($\text{CI}_{50} = 9,7 \mu\text{g/mL}$, IS = 6,2) (CHIANG et al., 2005).

Diidroisocumarinas são produtos naturais de ocorrência mais restrita, os quais apresentam diversas atividades biológicas, incluindo atividade antiviral frente ao HIV (ZHANG et al., 2018) e ao vírus da gripe suína (H1N1) (WANG et al., 2013). Além disso, foi relatada atividade antiviral frente a um vírus que afeta peixes de água doce ou salgada (vírus da necrose hematopoiética infecciosa) (HU et al., 2019). No presente trabalho avaliamos a atividade anti-ZIKV de uma diidroisocumarina isolada de *Xyris pterygoblephara*, a (3R,4R)-(-)-6-metoxi-3,4-diidro-3-*n*-pentil-4-acetoxi-1H-2-benzopirran-1-ona (**40**) (**C3**), para a qual foi relatada a atividade frente a isolados hospitalares de fungos dermatófitos (GUIMARÃES et al., 2008). No entanto, ela se mostrou inativa frente ao ZIKV nas concentrações avaliadas (Figura 23).

5.3.3 Padronização das condições experimentais do ensaio de atividade antiviral em células SH-SY5Y

Células Vero são células de mamíferos, susceptíveis à infecção por diferentes espécies de vírus, e constituem um modelo experimental adequado para a triagem inicial, visando identificar extratos com atividade antiviral. A fim de confirmar os resultados obtidos em células Vero CCL-81, e também utilizar um sistema mais translacional (linhagem humana), os extratos ativos foram testados em células neuronais, modelo característico para infecção por ZIKV. A escolha da linhagem celular utilizada no presente trabalho, SH-SY5Y, foi baseada em dados da literatura. Segundo Luplertlop e colaboradores (2017), o ZIKV infecta eficientemente culturas *in vitro* de células SH-SY5Y. Portanto, elas são utilizadas como modelo *in vitro* de células neuronais adultas de humanos. Os efeitos causados nestas células podem se correlacionar com os efeitos neuropatológicos do ZIKV em adultos humanos infectados (LUPLERTLOP et al., 2017).

Para a realização dos experimentos inicialmente foi necessário realizar o preparo da solução estoque do ZIKV. O ZIKV foi multiplicado em células C6/36 e o título viral da solução

foi de $6,6 \times 10^7$ UFP/mL. Baseado no título viral para realização dos ensaios em células SH-SY5Y foi necessário determinar a multiplicidade de infecção (MOI) no tempo de 48 horas, tempo previamente padronizado no laboratório. No ensaio do MTT, a MOI de 0,001 resultou em viabilidade celular de cerca de 60 % e não se observou diferença estatística entre a carga viral dos grupos analisados (Figura 24). Por esse motivo, foi escolhida a MOI de 0,001 para realização dos testes antivirais. Esta MOI foi substancialmente inferior às adotadas por Luplertlop e colaboradores (2017), MOI de 1, e por Braz-De-Melo e colaboradores (2019), MOI de 10, ambos utilizando a linhagem de células SH-SY5Y. Uma justificativa para isso seria que provavelmente o isolado clínico de ZIKV utilizado no presente trabalho ser mais virulento que aqueles empregados nos estudos supracitados.

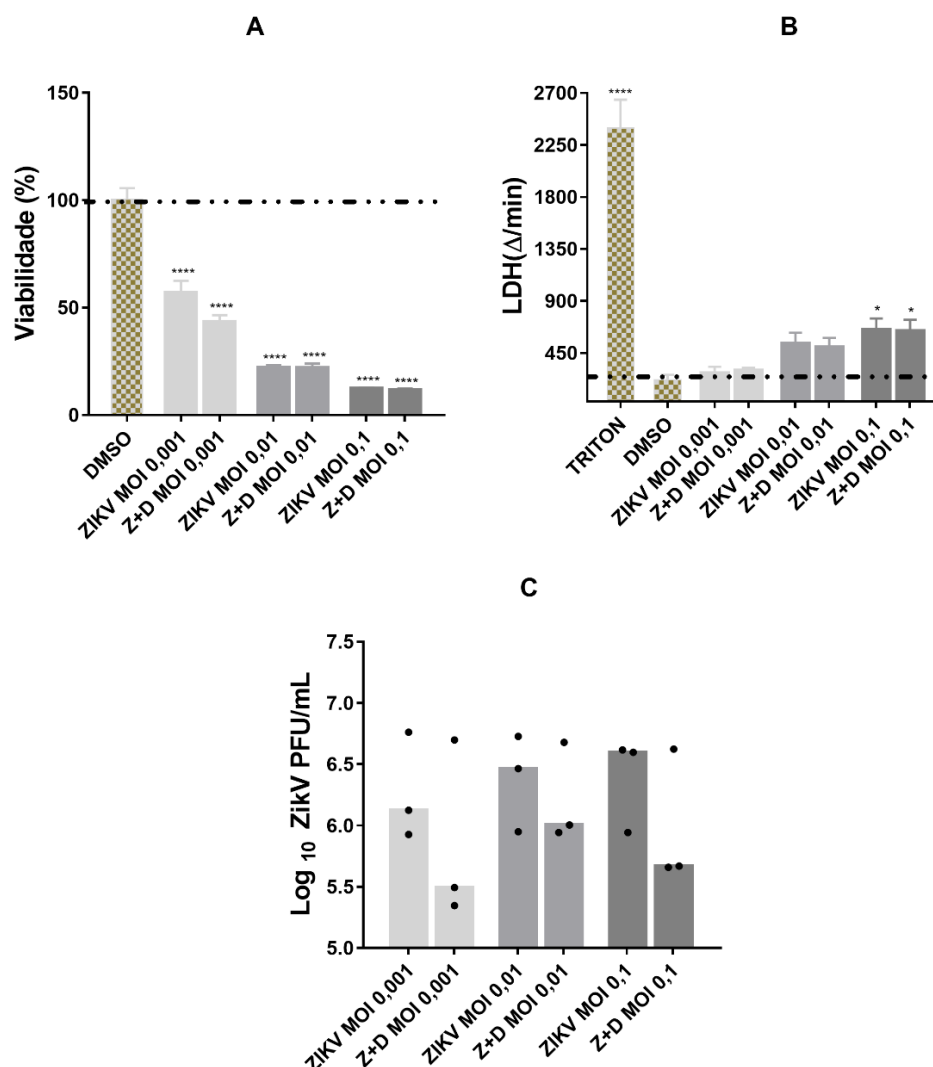


Figura 24. Padronização da MOI do ZIKV em células SH-SY5Y, utilizando método do MTT (A), LDH (B) e determinação da carga viral (C).

Para o MTT e LDH, as barras representam valores médios \pm SEM, onde * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ versus grupo controle de células. A carga viral foi determinada pelo teste de redução da placa de lise viral e as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Z+D = ZIKV+DMSO. Linha tracejada = controle de células, sem ZIKV.

5.3.4 Citotoxicidade dos extratos selecionados em células SH-SY5Y

A partir da triagem de atividade antiviral em células Vero CCL-81 infectadas pelo ZIKV, os 13 extratos ativos foram selecionados para avaliação na linhagem celular humana SH-SY5Y: *E. grandiflorus* (1), *B. calvescens* (7), *B. imbricata* (11), *B. magnifica* (13), *B. opuntioides* (15), *M. acanthophylla* (24), *M. ilicifolia* (diclorometânico (25) e metanólico (26)), *M. rigida* (27), *M. truncata* (28), *T. phaeocarpa* (29), *T. glabrescens* (30) e *O. spectabilis* (36). Inicialmente, a citotoxicidade dos extratos nessa linhagem celular foi avaliada nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/mL pelos métodos do MTT e LDH. Os extratos não foram citotóxicos, exceto o extrato de *B. imbricata* na concentração de 30 µg/mL (Figura 25).

A citotoxicidade de alguns extratos vegetais já foi avaliada nessa linhagem celular. Lantto e colaboradores (2009) avaliaram a citotoxicidade de extratos aquosos de folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum*), zimbro (*Juniperus communis*), louro (*Laurus nobilis*) e salsa (*Petroselinum crispum*), além dos compostos fenólicos curcumina e resveratrol, em células SH-SY5Y, utilizando ensaios de MTT e LDH. A curcumina diminuiu significativamente a viabilidade celular >50% nas concentrações de 25, 50 e 100 µM. Já os extratos reduziram a viabilidade celular em mais de 50% na concentração de 2,0 mg/mL, concentração marcadamente superior àquela utilizada no presente trabalho.

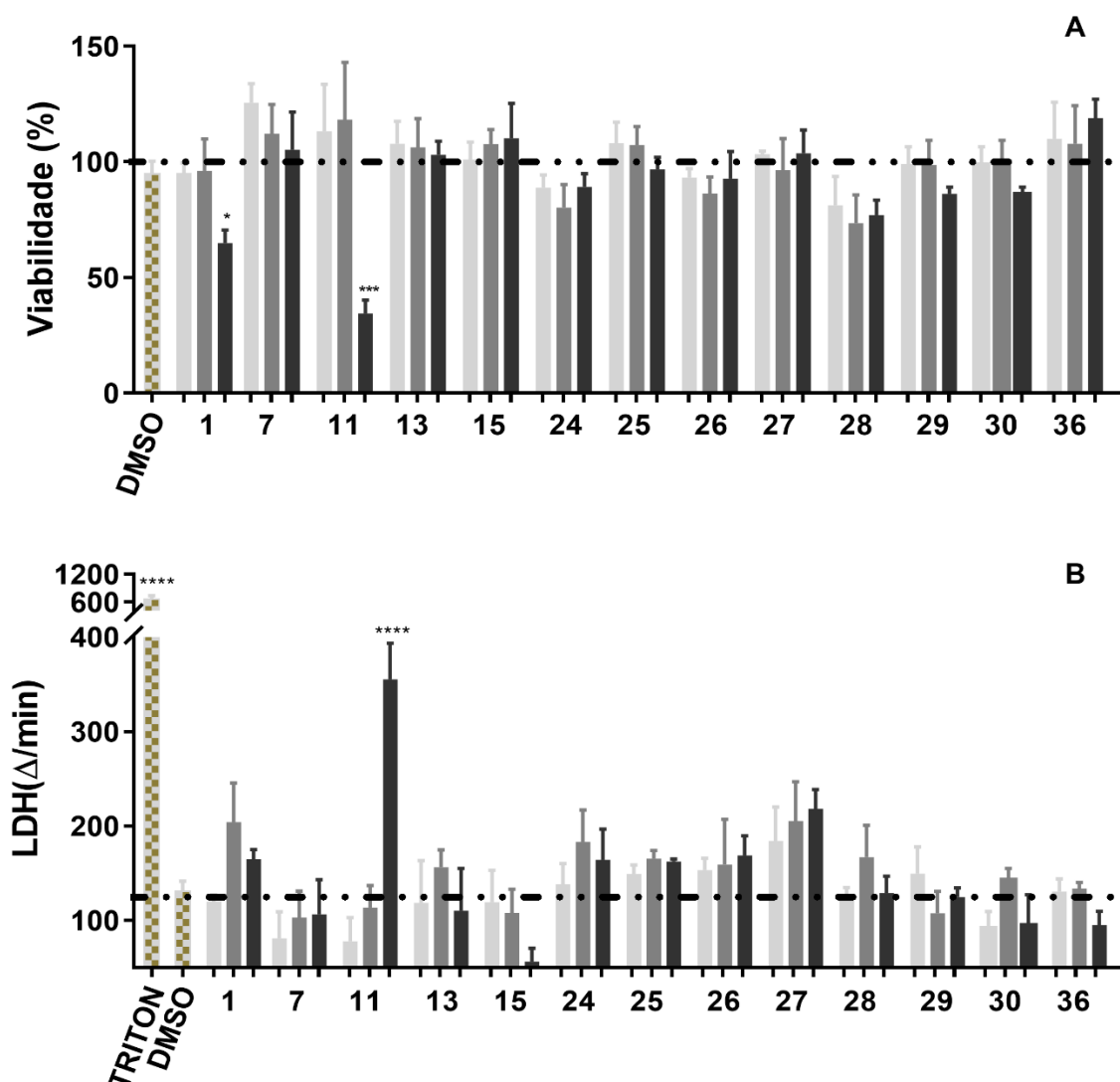


Figura 25. Citotoxicidade dos extratos selecionados em células SH-SY5Y, empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).

Vide tabela 1 da seção experimental para identificação dos extratos (item 4.8). Os extratos foram testados a 3 µg/mL (barras cinza-claras), 10 µg/mL (barras cinza-médias) e 30 µg/mL (barras pretas). As barras representam valores médios ± SEM, onde * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem extrato.

5.3.5 Atividade dos extratos selecionados frente à infecção pelo ZIKV em células humanas SH-SY5Y

Os extratos foram, então, avaliados quanto sua atividade antiviral frente ao ZIKV em células humanas SH-SY5Y. Nesse ensaio, foram empregadas as mesmas concentrações do teste de citotoxicidade (3, 10 e 30 µg/mL), exceto para o extrato de *B. imbricata*, o qual foi avaliado a 0,3, 3 e 10 µg/mL. Os extratos de *E. grandiflorus* (1,7 log de inibição da carga viral) (1), *M. ilicifolia* (extrato diclorometânico; 4,5 log) (25), *M. rigida* (1,7 log) (27), *T. phaeocarpa* (3,7 log) (29) e *T. glabrescens* (3,2 log) (30), reduziram significativamente a carga viral na concentração de 30 µg/mL (Figura 26C). A viabilidade celular das células infectadas e tratadas

não foi alterada em comparação ao grupo controle (ZIKV+DMSO) (Figura 26A), indicando um efeito antiviral dos extratos testados.

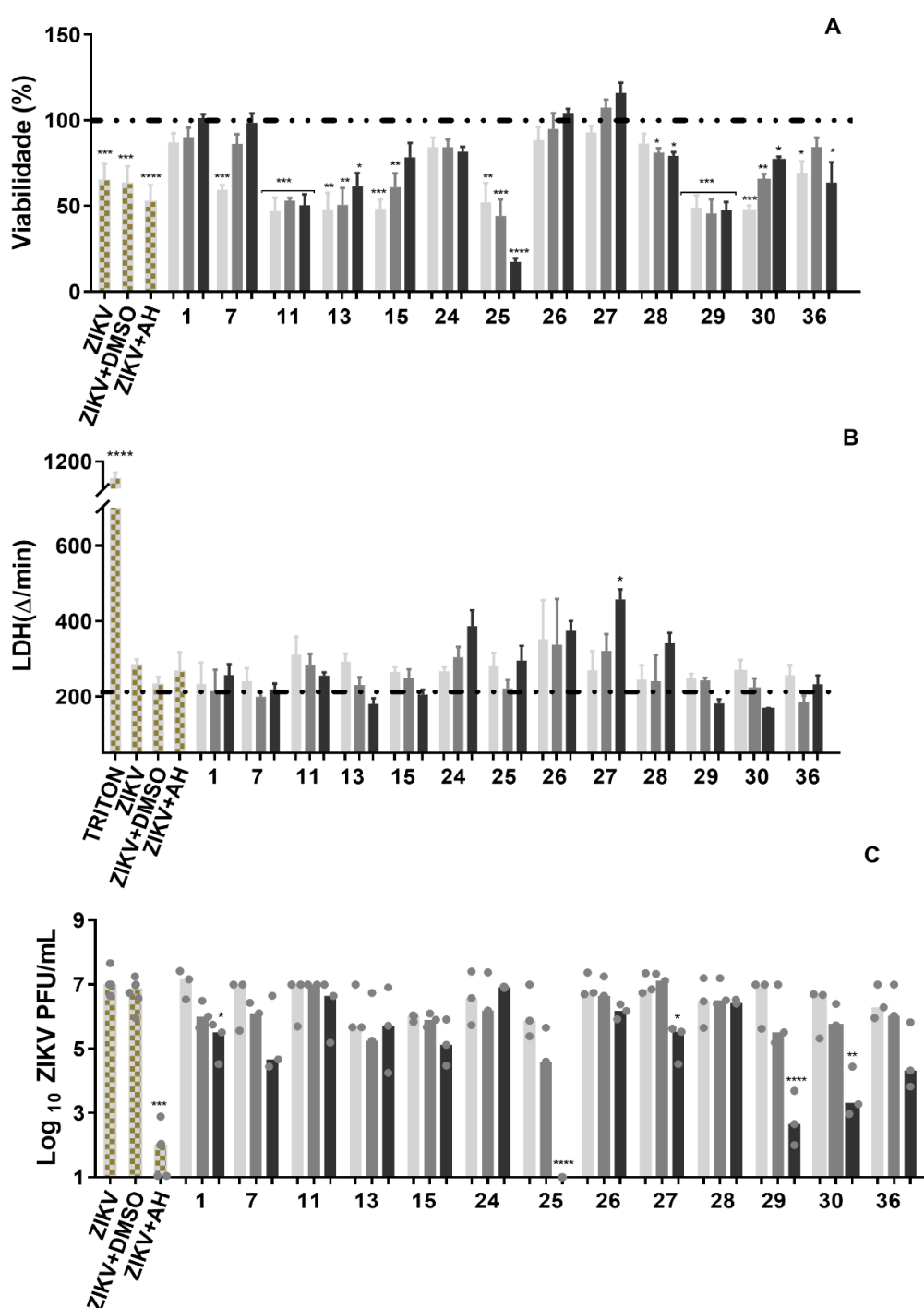


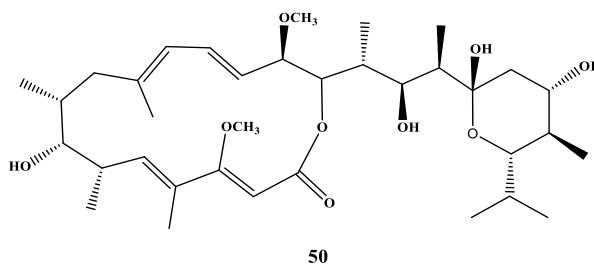
Figura 26. Efeito dos extratos seleccionados frente ao ZIKV, ensaiados em células SH-SY5Y, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).

Vide tabela 1 para identificação dos extratos (item 4.8). Os extratos foram testados a 3 μg/mL (barras cinza-claras), 10 μg/mL (barras cinza-médias) e 30 μg/mL (barras pretas), exceto 11 (testado a 0,3, 3 e 10 μg/mL, respectivamente). Para MTT e LDH, as barras representam valores médios ± SEM, onde * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 *versus* grupo de controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Para carga viral as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey (ZIKV+tratado *versus* ZIKV+DMSO), onde * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001. AH-D foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem extrato e ZIKV.

É importante destacar que, até o presente, não foram encontrados relatos na literatura sobre a avaliação da atividade antiviral de extratos de plantas frente ao ZIKV em células SH-SY5Y. Por outro lado, a atividade anti-ZIKV de alguns produtos naturais já foi avaliada nessa linhagem celular.

Braz-De-Melo e colaboradores (2019) relataram que células SH-SY5Y pré-tratadas com o ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (12,5 μM) previamente à infecção pelo ZIKV apresentou redução da carga viral e restaurou a viabilidade celular das células infectadas. Os autores concluíram que o ômega-3 tem um potencial efeito neuroprotetor frente à infecção pelo ZIKV e poderia ser uma ferramenta útil no tratamento contra o ZIKV. A isoquercitrina (100 μM) aboliu o crescimento de ZIKV em células SH-SY5Y (GAUDRY et al., 2018)

Em trabalho de Sabino e colaboradores (2019), células pré-tratadas com 10 nM de bafilomicina A1 (**50**), um produto natural de origem bacteriana, apresentou atividade frente ao ZIKV em células SH-SY5Y e A549, reduzindo a carga viral. O mecanismo de ação investigado em células A549 foi a inibição da adsorção do ZIKV à célula, impedindo a disseminação da infecção e interferindo na maturação viral.



Há também relatos sobre a atividade anti-ZIKV testada em células neurais distintas. Assim, o análogo de nucleosídeo 2'-C-metilcitidina ($\text{CC}_{50} = >100$, $\text{EC}_{50} = 0,297 \mu\text{M}$ e $\text{IS} = >300$) mostrou atividade anti-ZIKV em células-tronco neurais fetais humanas (BERNATCHEZ et al., 2018). O tratamento da mesma linhagem celular com cloroquina (50 μM) diminuiu em 57% o número de células infectadas pelo ZIKV e a avaliação da viabilidade celular protegeu 70% dessas células durante a infecção, sem efeitos de citotoxicidade. A infecção por ZIKV em neuroesferas de camundongos (células do sistema nervoso central de embriões de camundongos) foi diminuída pelo tratamento com cloroquina (12,5 μM) (DELVECCHIO et al., 2016). O ácido betulínico mostrou uma atividade antiviral dependente da concentração em células progenitoras neurais humanas infectadas pelo ZIKV, atingindo quase 100% de inibição a 50 μM (CAVALCANTE et al., 2020).

Até onde sabemos, não há relatos anteriores sobre a atividade de extratos vegetais contra células SH-SY5Y infectadas por ZIKV, destacando assim a relevância dos dados aqui apresentados.

5.3.6 Valores de CC₅₀, CE₅₀ e IS para os extratos selecionados

Os extratos de *M. rigida*, *M. truncata*, *E. grandiflorus*, *M. ilicifolia* (diclorometânico e metanólico), *B. calvescens*, *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa*, que apresentaram atividade frente ao ZIKV, foram selecionados para determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) nas linhagens celulares Vero CCL-81 e SH-SY5Y. Os extratos foram avaliados em 8 concentrações (480 - 3,125 µg/mL) empregando o ensaio colorimétrico do MTT. Optou-se por testar não só os extratos ativos em SH-SY5Y, a fim de verificar como os extratos se comportam frente às duas linhagens celulares utilizadas e, ao mesmo tempo, comparar a citotoxicidade entre eles.

Os valores de CC₅₀ obtidos em células Vero CCL-81 foram significativamente maiores que aqueles determinados para a linhagem SH-SY5Y (Tabela 12). Apesar de serem duas linhagens de células imortalizadas, as células SH-SY5Y são células neuronais, mais sensíveis quando expostas a xenobióticos, e mais responsivas ao dano celular induzido por eles, o que justificaria a diferença observada.

Tabela 12. Valores de citotoxicidade para 50% das células (CC₅₀), determinados para os extratos selecionados, em linhagens de células Vero CCL-81 e SH-SY5Y.

Espécie	Número do extrato	Parte	Extrato	CC ₅₀ (µg/mL, média ± DP)	
				Vero CCL-81	SH-SY5Y
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	1	Folhas	Etanólico	398,1 ± 26,4	96,8 ± 17,3
<i>Baccharis calvescens</i>	7	Folhas	Etanólico	345,3 ± 24,5	151,1 ± 13,8
<i>Maytenus ilicifolia</i>	25	Folhas	Diclorometânico	158,9 ± 17,3	57,2 ± 16,7
<i>Maytenus ilicifolia</i>	26	Folhas	Metanólico	> 480	193,6 ± 9,9
<i>Maytenus rigida</i>	27	Raízes	Etanólico	> 480	107,1 ± 19,3
<i>Maytenus truncata</i>	28	Folhas	Etanólico	> 480	135,9 ± 5,5
<i>Terminalia phaeocarpa</i>	29	Folhas	Etanólico	> 480	104,8 ± 28,9
<i>Terminalia glabrescens</i>	30	Folhas	Etanólico	> 480	130,2 ± 27,5

Os extratos de *M. ilicifolia* (extrato diclorometânico), *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens*, que exibiram maiores valores de redução de placas de lise do ZIKV (4,5 log, 3,7 log e 3,2 log de redução, respectivamente) foram selecionados para determinação da concentração efetiva para 50 % das células (CE₅₀) na linhagem celular SH-SY5Y. Os extratos foram avaliados em 8 concentrações (300 - 0,1 µM) empregando o ensaio de titulação viral. Optou-se por testar somente os extratos mais ativos em SH-SY5Y por serem mais promissores, visando calcular os índices de seletividade (IS).

Valores de CE₅₀ de 16,8 ± 10,3 µg/mL, 22,0 ± 6,8 µg/mL e 20,4 ± 10,2 µg/mL foram obtidos, respectivamente, para extratos de *M. ilicifolia*, *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens*, com IS correspondente de 3,4, 4,8 e 6,4. Valores de IS maiores que 4 são recomendados para um composto antiviral (LYU et al., 2005). Vale ressaltar que, não foram encontrados relatos na literatura sobre a avaliação da atividade antiviral desses extratos frente ao ZIKV. Adicionalmente, ainda há poucos estudos com valores de CC₅₀, CE₅₀ e IS para espécies de *Maytenus* e *Terminalia* determinados em outras linhagens celulares e/ou frente a outros vírus.

O extrato etanólico de *Terminalia chebula* apresentou atividade antiviral frente ao vírus do herpes simples tipo 2, de maneira dependente da concentração, exibindo CC₅₀ = 409,71 ± 47,70 µg/ml, CE₅₀ = 0,01 ± 0,0002 µg/ml e IS de 40,90 em células Vero (KESHARWANI et al., 2017). Já o extrato metanólico de *Terminalia ivorensis* foi ativo contra echovírus sorotipo E-7 em células de rabdiossarcoma humano, apresentando CC₅₀ = 12,14 µg/mL, CE₅₀ = 0,01 µg/mL e IS = 1213,4 (OGBOLE et al., 2018).

Os extratos etanólico e aquoso de *Maytenus ilicifolia* apresentaram atividade anti-herpética (herpes simples tipo 1) quando testados em células Vero CCL-81 (MONTANHA et al., 2004). Para *Maytenus senegalensis*, o extrato metanólico inibiu o efeito citopático induzido pelo vírus da imunodeficiência humana sorotipo 1 (HIV-1) em células MT-4 humana (CC₅₀ = 250 µg/mL e CE₅₀ = 48,2 ± 0,9 µg/mL) (HUSSEIN et al., 1999).

Portanto, os extratos de *M. ilicifolia*, *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* foram considerados fontes promissoras de constituintes antivirais. Espera-se que o fracionamento destes extratos proporcione o isolamento de compostos com índices seletivos ainda mais significativos.

5.3.7 Avaliação preliminar do mecanismo de ação antiviral dos extratos selecionados

A investigação preliminar do mecanismo de ação antiviral foi realizada em células Vero CCL-81 devido a existência de estudos anteriores neste tipo de célula (CLAIN et al., 2018, CLAIN et al., 2019, FERREIRA et al., 2019), o que possibilitaria a comparação de resultados,

bem como a facilidade de cultivo dessa linhagem celular. Foram avaliados os extratos de *M. rigida*, *M. truncata*, *E. grandiflorus*, *M. ilicifolia* (diclorometânico e metanólico), *B. calvescens*, *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa*. Optou-se por investigar o mecanismo de ação não só dos extratos ativos na SH-SY5Y, a fim de verificar se os extratos ativos agem por vias semelhantes ou não.

Inicialmente, avaliou-se o efeito profilático dos extratos selecionados. Os extratos selecionados foram avaliados na concentração de 30 µg/mL. Como pode observado na Figura 27, nenhum dos extratos foi capaz de inibir a infecção pelo ZIKV, visto que não houve redução significativa da carga viral, quando comparada ao controle de vírus. Portanto, conclui-se que a atividade antiviral observada para os extratos não ocorre via efeito profilático.

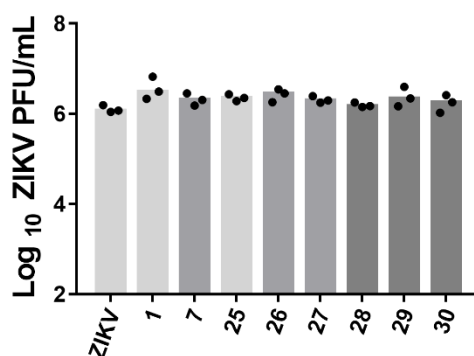


Figura 27. Carga viral obtida no ensaio de efeito profilático para os extratos selecionados frente ao ZIKV.

1 = *Echinodorus grandiflorus*; 7 = *Baccharis calvescens*; 25 = *Maytenus ilicifolia* (extrato diclorometânico); 26 = *Maytenus ilicifolia* (extrato metanólico); 27 = *Maytenus rigida*; 28 = *Maytenus truncata*; 29 = *Terminalia phaeocarpa* e 30 = *Terminalia glabrescens*. As barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica.

O mecanismo de ação de uma fração rica em compostos fenólicos, obtido das partes aéreas de *Baccharis anomala*, foi avaliado frente ao herpes simples tipo 1 em células Vero (VENTURI et al., 2018). O pré-tratamento de células Vero com a fração supracitada não foi capaz de impedir a ligação do vírus às mesmas, de maneira semelhante ao aqui observado para *B. calvescens* e os demais extratos avaliados.

Entretanto, alguns extratos ricos em compostos fenólicos mostram-se efetivos para interferir no processo de adsorção do ZIKV. Segundo Clain e colaboradores (2019), o extrato aquoso de partes aéreas de *Psiloxylon mauritianum*, rico em fenólicos, interferiu na ligação das partículas virais do ZIKV às células Vero. Já o extrato etanólico de folhas de *Ocimum basilicum* inibiu a ligação e a entrada do ZIKV às células Vero (SINGH et al., 2019). Na mesma direção, a curcumina alterou o processo de adsorção do vírus Zika e Chikungunya às células HeLA de

forma concentração dependente (MOUNCE et al., 2017). O ácido elágico isolado de *Punica granatum* também interferiu na ligação das partículas virais do ZIKV às células Vero (ACQUADRO et al., 2020).

Na sequência do presente trabalho, avaliou-se o efeito dos extratos selecionados na etapa de internalização da partícula viral. Esta é a segunda etapa do ciclo de replicação do vírus, onde ele penetra na célula hospedeira e libera seu RNA, através de ações enzimáticas de componentes da membrana celular. Como pode ser visto na Figura 28, os extratos não apresentaram atividade inibitória sobre a infecção do ZIKV, pois não houve redução da carga viral, quando comparada ao controle de vírus. Portanto, os extratos não atuam na internalização da partícula viral.

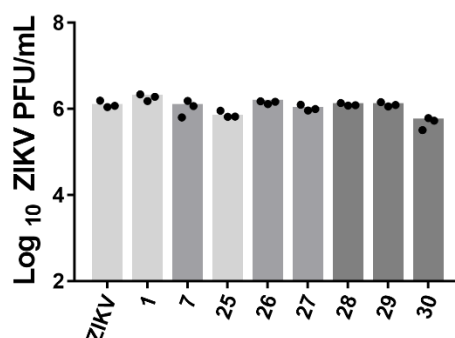


Figura 28. Carga viral obtida no ensaio de internalização da partícula viral, para os extratos selecionados frente ao ZIKV.

1 = *Echinodorus grandiflorus*; 7 = *Baccharis calvescens*; 25 = *Maytenus ilicifolia* (extrato diclorometânico); 26 = *Maytenus ilicifolia* (extrato metanólico); 27 = *Maytenus rigida*; 28 = *Maytenus truncata*; 29 = *Terminalia phaeocarpa* e 30 = *Terminalia glabrescens*. As barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica.

A atividade anti-ZIKV de alguns produtos naturais de plantas se dá por ação na etapa de internalização da partícula viral. Segundo Gaudry e colaboradores (2018), a isoquercitrina atua na entrada do ZIKV, impedindo a internalização das partículas virais na célula hospedeira, mecanismo avaliado em células A549. Por sua vez, Carneiro e colaboradores (2016) relataram que o mecanismo de ação do galato de epigalocatequina, constituinte de algumas das oito espécies de plantas selecionadas para triagem (Tabela 11), se dá por inibição da entrada do ZIKV nas células Vero. Em estudo *in silico*, o galato de epigalocatequina apresentou alta afinidade pela proteína E do ZIKV (dímeros I e III), impedindo a mudança conformacional do dímero III, requerida para entrada do ZIKV nas células hospedeiras (SHARMA et al., 2017). Além disso, o galato de epigalocatequina foi relatado por Calland e colaboradores (2011) como inibidor da entrada do vírus da hepatite C em células Huh-7.

O extrato aquoso de partes aéreas de *Aphloia theiformis* inibiu a penetração de ZIKV em células Vero (CLAIN et al., 2018). Já o extrato etanólico de folhas de *Phyllanthus phillyreifolius* e a geraniina, um elagitanino constituinte, foram capazes de inibir a etapa de internalização do ZIKV nas células A549 (HADDAD et al., 2020). Outro tanino hidrolisável, a casuarinina, isolado de cascas de *Terminalia arjuna* atua nos processos de adsorção e internalização do vírus do herpes simples tipo 2 às células Vero, e também apresentou efeito virucida (CHENG et al., 2002). Já o éter dimetil-timo-hidroquinona, isolado do óleo essencial de *Ayapana triplinervis*, é um inibidor do processo de internalização do ZIKV em células A549 (HADDAD et al., 2019b).

Extratos vegetais são misturas complexas, cujas composições químicas são variáveis em função do solvente extrator utilizado. Por sua vez, a composição química de um extrato influencia diretamente sua atividade antiviral e mecanismo de ação. Assim, um extrato hexânico de *Tontelea micranta*, rico em triterpenos, apresentou atividade anti-ZIKV na concentração de 15,6 µg/mL, promovendo ação virucida em células Vero. Já os extratos em acetato de etila e metanólico da espécie foram ativos nas concentrações de 31,2 e 15,6 µg/mL, e atuaram nos estágios de adsorção e internalização viral, respectivamente (FERREIRA, et al., 2019).

O esteroide silvestrol, isolado de *Aglaia foveolata*, bloqueiou a tradução do genoma viral do ZIKV em células 4549 (ELGNER et al., 2018). A flavanona pinocembrina, encontrada em plantas dos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, atua nos processos de pós-entrada do ciclo de replicação do ZIKV, inibindo a produção do RNA viral e a síntese de proteínas do envelope (LEE et al., 2019).

Dados da literatura sobre mecanismo de ação de extratos (*Doratoxylon apetalum* e *Aphloia theiformis*) e substâncias isoladas (esteroide silvestrol e polifenóis pinocembrina, galato de epigallocatequina e isoquercitrina), aqui brevemente revistos, indicam que eles atuam como antagonistas da entrada do ZIKV. Porém, nos ensaios preliminares para avaliação do mecanismo de ação dos extratos selecionados no presente estudo, observamos ausência de atividade nas etapas de adsorção e internalização da partícula viral. Assim, é factível supor que os extratos possuam efeito virucida. Eles podem atuar bloqueando alguma proteína viral e não a célula propriamente dita, ou inibir o ciclo de multiplicação do ZIKV, possivelmente em uma das etapas de síntese, montagem ou maturação viral.

Alguns polifenóis já foram descritos como ativos nas etapas de multiplicação viral. Segundo Lim e colaboradores (2017), flavonóis, flavonas e flavanonas, entre outros polifenóis, inibiram a atividade da enzima NS2B-NS3pro (responsável pela clivagem da poliproteína viral durante a etapa de replicação do vírus) do ZIKV de 6,2 a 88%, quando avaliados *in vitro* a

100 μM . Dentre as substâncias testadas, o flavonol miricetina foi a que apresentou melhor atividade inibitória enzimática, com CI_{50} de $22,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$. A quercetina, um flavonoide encontrado em muitas frutas, vegetais, folhas e grãos, é um inibidor da enzima NS2B-NS3pro do ZIKV, com CI_{50} de $26,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (ROY et al., 2018).

As proteínas alvos normalmente investigadas são as proteínas não estruturais do ZIKV, principalmente o domínio catalítico da metiltransferase do NS5 (responsável por limitar a extremidade 5' do RNA genômico viral), a serina protease do tipo NS2B-NS3 (desempenha um papel fundamental na replicação do vírus, contribuindo para o processamento da poliproteína viral), as helicases NS3 [exibem atividades de adenosina trifosfatase (ATPase) e RNA trifosfatase (RTPase)], e o domínio catalítico da RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp) (NS5) (BAZ e BOIVIN, 2019).

No presente trabalho, os extratos não apresentaram efeito profilático e não atuaram na etapa de internalização da partícula viral, sugerindo que seu mecanismo de ação se dá por outras vias a serem futuramente investigadas.

5.4 Estudo fitoquímico dos extratos selecionados

O extrato etanólico de folhas de *T. glabrescens* e o extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia* apresentaram atividade anti-ZIKV em células Vero CCL-81 e SH-SY5Y (item 5.3.2 e 5.3.5), sendo estes selecionados para estudo fitoquímico a fim de isolar e identificar os constituintes bioativos. O extrato de *T. phaeocarpa* também apresentou significativa atividade anti-ZIKV, porém não foi realizado seu estudo fitoquímico, visto que ele foi previamente realizado pelo nosso grupo de pesquisa (GOMES et al., 2021).

O estudo fitoquímico compreendeu inicialmente estudos de desreplicação, visando avaliar a composição química dos extratos e frações por UPLC-DAD-ESI-MS/MS e identificar constituintes previamente descritos para as espécies ou gêneros. Posteriormente buscou-se isolar e identificar os constituintes presentes, sendo empregadas técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas.

5.4.1 Caracterização química dos extratos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

5.4.1.1 Extrato etanólico e frações de folhas de *T. glabrescens*

O extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens* e as frações em acetato de etila (FrEtOAc) e metanólica (FrMeOH) foram analisadas por UPLC-DAD-ESI-MS/MS a fim de identificar os principais constituintes presentes, especialmente polifenóis característicos do gênero *Terminalia*. Os compostos foram identificados com base em seu padrão de fragmentação

MS/MS e por comparação com dados da literatura (BAJKACZ et al., 2018; SOBEH et al., 2019; CHANG et al., 2019; IGLESIAS-CARRES et al., 2019 e PEREIRA et al., 2020). Para as análises foram investigadas as transições íon-filho utilizando métodos de *multiple reaction monitoring* (MRM), previamente descritas na literatura para constituintes de *Terminalia*. Estas análises foram realizadas no modo de varredura (*scan*) íon-filho, condição em que cada transição MS/MS foi sintonizada com objetivo de elevar ao máximo a sensibilidade. As análises foram operadas no modo de ionização negativo em função da composição fenólica das matrizes analisadas.

Inicialmente foi obtido o cromatograma no modo *scan* com detecção no UV e nos modos ESI⁻ e ESI⁺ para o extrato (Figura 29) a fim de conhecer o perfil químico da amostra. A partir de dados da literatura para constituintes de espécies de *Terminalia*, foram selecionadas as faixas de transição de massas das substâncias a serem investigadas. A título de exemplo, apresenta-se a descrição da identificação do ácido quínico. Inicialmente selecionou-se a transição de MRM descrita na literatura para esta substância (m/z 191 \rightarrow m/z 127) (Figura 30). Em seguida, analisou-se o espectro de MRM, a fim de verificar se o perfil de fragmentação correspondia a faixa de transição procurada, referente a molécula de ácido quínico. O espectro de massas obtido (Figura 30b) apresentou o pico base em m/z 127 (100%), sugerindo a presença do ácido quínico no extrato. Para confirmar esta indicação, foi realizado o experimento de *daughter scan*, cujo valores de energia de colisão, faixa de massa, modo de operação e íon fragmentado para cada substância identificada estão descritos na Tabela 13. A análise do cromatograma *daughter scan* (Figura 31) comparado ao de MRM (Figura 30a) permitiu confirmar que o íon da molécula em questão elui no tempo de retenção de 0,58 min. Ao analisar o espectro de massas do *daughter* (Figura 32) confirmou-se que os íons em m/z 191,3, m/z 127 e m/z 84,8 são referentes às fragmentações da molécula de ácido quínico (Tabela 13) e, portanto, o ácido quínico é um constituinte presente no extrato etanólico das folhas de *T. glabrescens*. Este mesmo procedimento foi utilizado para todos os compostos identificados no extrato e nas frações de *T. glabrescens*, relatados na Tabela 13.

A comparação da composição química do extrato com as frações analisadas indicou que a FrEtOAc concentrou compostos de média polaridade, ao passo que a FrMeOH concentrou compostos de alta polaridade (Tabela 13). Os dados obtidos revelaram um total de 27 compostos fenólicos identificados no extrato etanólico, dos quais 22 e 19 constituintes também ocorreram na FrEtOAc e FrMeOH, respectivamente (Tabela 13).

É importante destacar que, até o momento, a composição química de *T. glabrescens* foi pouco investigada, com apenas um estudo fitoquímico descrito por Garcez et al. (2003). Do extrato etanólico de folhas de *T. glabrescens* foram isoladas as seguintes substâncias: 3 β ,6 β ,23,28-tetraidroxiolean-12-eno, ácidos ursólico, 2 α -hidroxiursólico, oleanólico, maslínico, arjunólico, sumaresinólico e asiático, além de esqualeno, fitol, sitosterol-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e *n*-alcanos. Por sua vez, o estudo fitoquímico do extrato etanólico das cascas do caule resultou no isolamento de friedelina, taraxerol, lupeol, lupenona, betulina, betulona, ácido betulínico, arjunglicosídeo I, estigmastano-3 β ,6 α -diol, β -sitosterol, (-) catequina, β -D-pirano-tagatose, β -D-furanofrutose e α -D-furanofrutose (GARCEZ et al., 2003). Portanto, no presente estudo a ocorrência dos compostos identificados na espécie foi relatada pela primeira vez. Por outro lado, a ocorrência da maioria dos compostos identificados já foi relatada em diferentes partes de outras espécies de *Terminalia*, tais como *T. arjuna*, *T. chebula*, *T. bellerica*, *T. catappa*, *T. elliptica*, *T. paniculata*, *T. muelleri*, *T. ivoriensis*, *T. sericea*, *T. parviflora*, *T. triflora*, *T. horrida*, *T. calamansanai*, *T. macroptera*, *T. citrina*, *T. ferdinandiana*, *T. brownie*, *T. argentea*, *T. oblongata*, *T. nigrovenulosa*, *T. superba*, *T. pallida* e *T. elliptica* (SINGH et al., 2016a; SINGH et al., 2016b; SHENG et al., 2016; SHENG et al., 2018; SOBEH et al., 2019; CHANG et al., 2019; FAHMY et al., 2015).

Os flavonoides (narigenina, canferol, catequina/epicatequina, isoramnetina, miricetina, galoil hexosídeo, vitexina, astragalina, quercetina-*O*-hexosídeo, hiperosídeo, hexahidroxi-difenil (HHDP) hexosídeo, dímero de procianidina B2/B1, rutina, hesperidina e galoil-HHDP-hexosídeo) foram o maior grupo de metabólitos identificados, seguidos dos ácidos fenólicos (ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido gálico, ácido 3-(4-hidroxifenil) propionico, ácido homovanílico, ácido quínico e ácido elágico) e elagitaninos (corilagina, punicalina, terflavina b e punicalagina). Seis dos 19 compostos previamente descritos por Silva Beserra et al. (2018) em *T. argentea* (ácido gálico, ácido quínico, ácido elágico, quercetina ramnosídeo corilagina e punicalina) também foram identificados em *T. glabrescens*. Ainda, doze (ácidos *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, gálico, quínico e elágico, além de miricetina, galoil hexosídeo, astragalina, quercetina ramnosídeo, corilagina, punicalina e terflavina B) dos 38 compostos previamente descritos em *T. phaeocarpa* (GOMES et al., 2021) foram identificados em *T. glabrescens*.

Portanto, diversos dos compostos aqui identificados em *T. glabrescens* também foram relatados em outras espécies de *Terminalia*, corroborando a similaridade química das espécies e que o gênero é uma fonte de compostos polifenólicos, incluindo taninos hidrolisáveis.

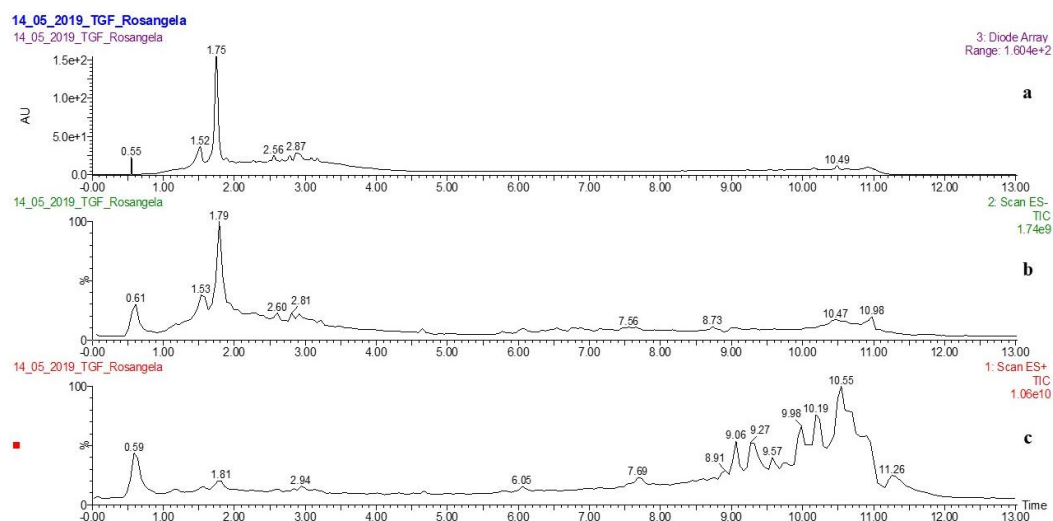


Figura 29. Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS para o extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens* no modo *scan* com detecção no UV (a) e nos modos ESI⁻ (b) e ESI⁺ (c) para análise do perfil exploratório. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

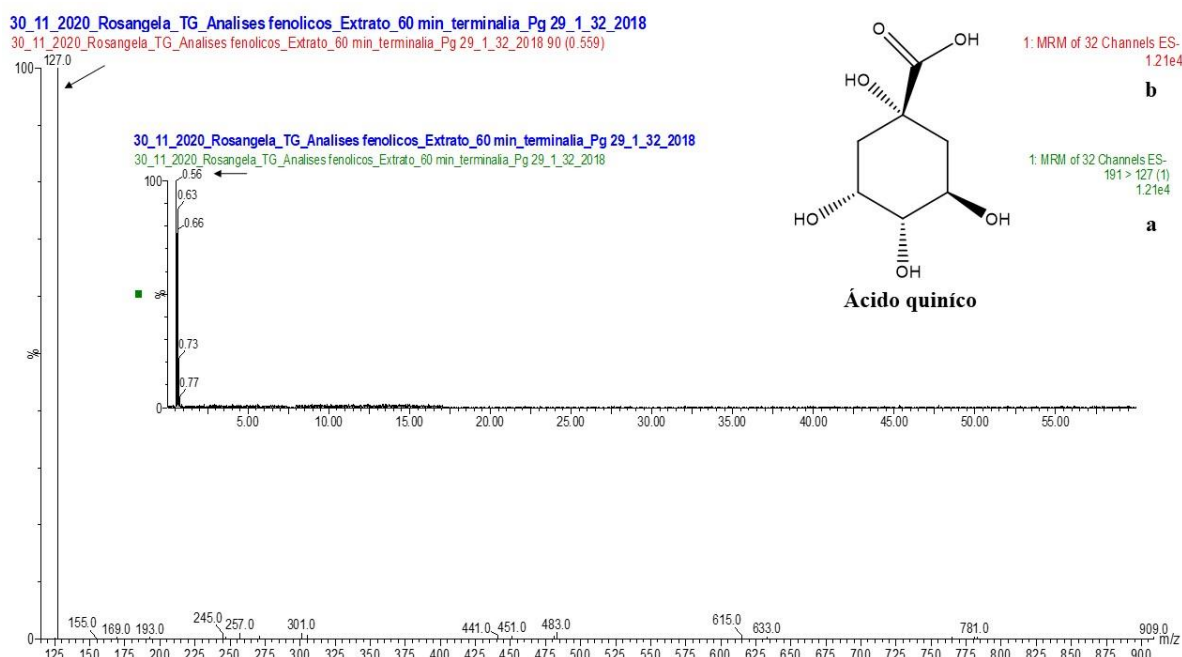


Figura 30. Espectro de MRM para a transição m/z 191 \rightarrow 127 (a) e espectro de massas MS/MS para o íon em m/z 191 Da (b) obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS para o extrato etanólico (EE) das folhas de *T. glabrescens* adquiridos no modo de ionização negativa (ESI⁻). Condições de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

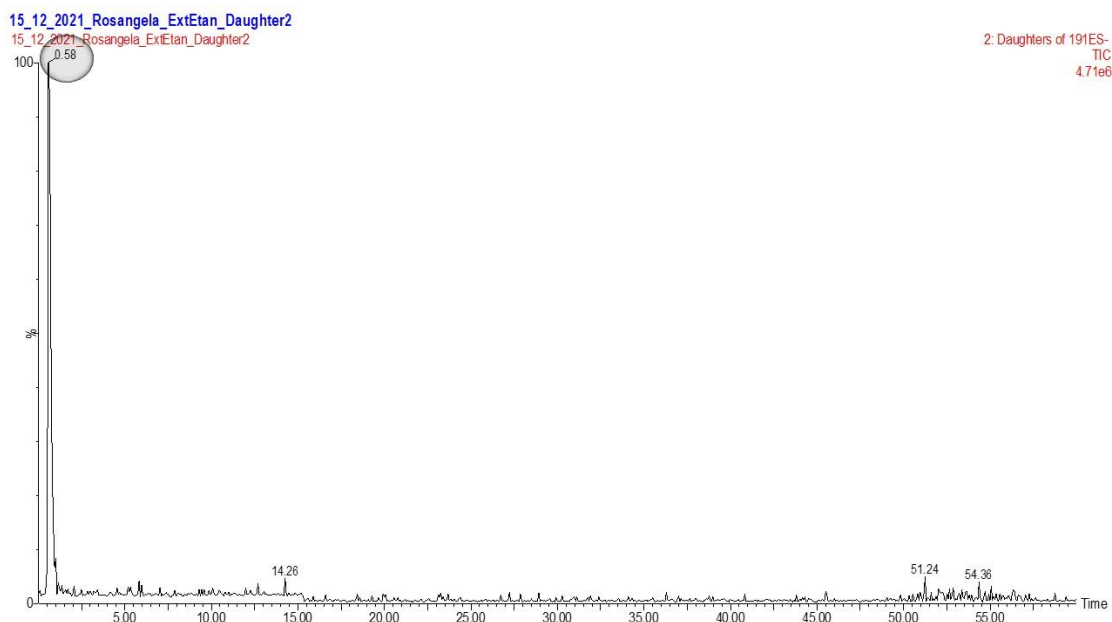


Figura 31. Cromatograma obtido no experimento de *Daughter scan* (ESI⁻) para o íon em m/z 191 Da por UPLC-DAD-ESI-MS/MS para o extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

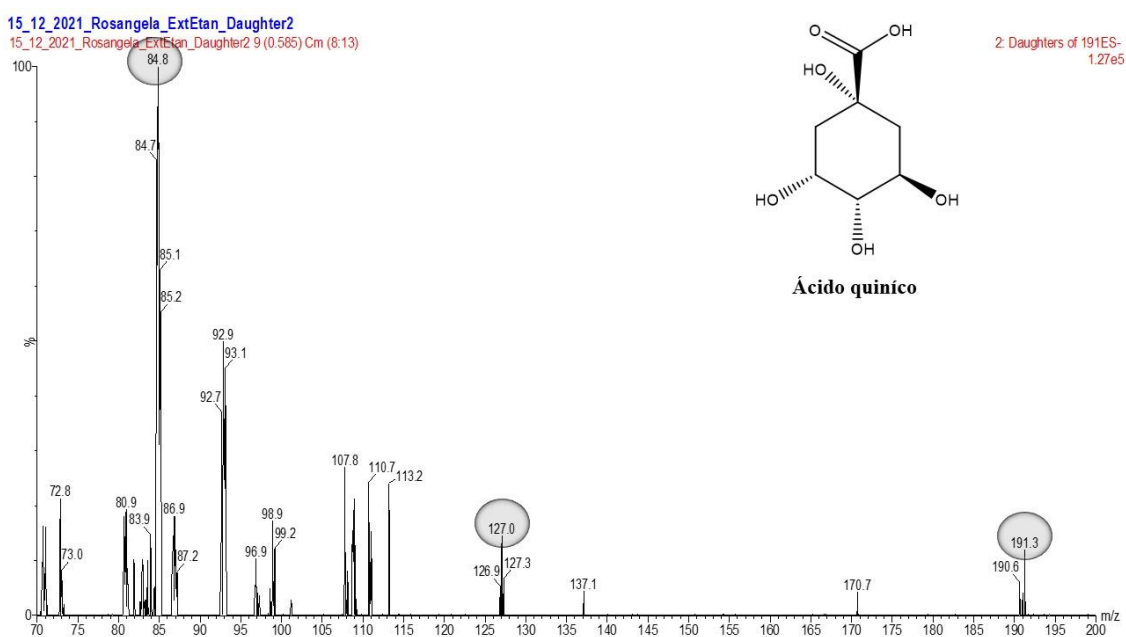


Figura 32. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI⁻) para o íon em m/z 191 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância destacada no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

Tabela 13. Substâncias identificadas putativamente por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no extrato etanólico (EE), nas frações em acetato de etila (FrEtOAc) e metanólica (FrMeOH) de *T. glabrescens*.

Substância (em ordem alfabética)	TR (min)	[M-H] ⁻ (Da)	MS>MS (Da)	Dados espectroscópicos: energia de colisão (V); faixa de massa (<i>m/z</i>)	EE	FrEtOAc	FrMeOH
Ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico	0,69	165,1	121	Rampa (5-17)70 – 200	x	-	-
Ácido elágico	17,49	301,1	257, 229	Rampa (5-50); 70 – 630(5-50)	x	x	x
Ácido gálico	0,90	169,1	124,9, 78,9	50; 70 – 200	x	x	x
Ácido genístico	1,66	152,9	109,3	Rampa (10-30) 70 – 160	x	x	x
Ácido homovanílico	0,57	181	136,7	Rampa (5-17) 70 – 280(5-30)	x	x	-
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	1,85	136,9	93,0	18; 70 – 280	x	x	-
Ácido protocatecuico	1,65	153,1	109, 108	16; 70 – 160	x	x	x
Ácido quinico	0,58	191	127, 85	40; 70 – 200(5-30)	x	x	x
Astragalina	19,00	447,1	300, 284	15; 100 – 450(5-60)	x	x	-
Canferol	21,14	285	257, 229	Rampa (5-27)70 – 300 (5-49)	x	x	-
Catequina/epicatequina	3,79	289	245,1, 205, 203, 179, 137, 125	Rampa (5-27)70 – 300 (5-49)	x	x	x
Corilagina	4,67	633	301, 249	Rampa (5-59)70 – 660 (5-80)	x	x	x
Galoil hexosídeo	0,81	331	271, 211, 169	20; 70 – 365 (5-50)	x	x	x

Tabela 13. Continuação

Galoil-HHDP-hexosídeo	2,67	633,0	301, 275	Rampa (5-59)70 – 650 (5-80)	x	x	x
Hesperidina	17,36	609	301	Rampa (5-56)100 – 620 (5-77)	x	x	x
Hexahidroxidifenoil (HHDP) hexosídeo	0,59	481	301, 275	(6-40); 100 – 510 (5-60)	x	x	x
Hiperosídeo	17,32	463,1	300	Rampa (6-40); 100 – 470 (5-60)	x	x	x
Isoramnetina	19,98	315	300	Rampa (5-33); 70 – 365(5-60)	x	x	-
Miricetina	20,76	317,2	151	Rampa (5-29); 100 – 365(5-50)	x	x	-
Narigenina	22,27	271,1	151,1	Rampa (5-27)70 – 300 (5-49)	x	x	-
Procianidina dímérica B2/B1	3,64	577	407, 289	Rampa (6-50)100 – 600 (5-60)	x	-	x
Punicalagina	4,96	1083	1030, 781, 601, 575	Rampa (6-100)100 – 1090(5-110)	x	-	x
Punicalina	4,65	781	601, 451, 300	Rampa (6-74)100 – 800 (5-100)	x	-	x
Quercetina- <i>O</i> -hexosídeo	19,08	447,4	301, 179, 151	Rampa (6-40)100 – 450(5-60)	x	x	x
Rutina	17,43	609	300, 301	Rampa (5-56)100 – 620 (5-77)	x	x	x
Terflavina B	8,49	783,0	759, 451	Rampa (6-74)100 – 800 (5-100)	x	-	x
Vitexina	17,13	431	341, 311, 283, 269, 120	Rampa (5-42)70 – 450(5-60)	x	x	x

x = identificado

- = não identificado

5.4.1.2 Extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia*

A composição química de *M. ilicifolia* compreende principalmente flavonoides, triterpenos e esteroides (ZHANG et al., 2020). Assim, devido a polaridade buscou-se detectar triterpenos e esteroides no extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia* a partir das análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS. As análises foram realizadas de maneira semelhante àquela descrita para o extrato de *T. glabrescens* (item 5.4.1.1). Porém, empregaram-se valores fixos de energia de colisão e faixa de massa, bem como utilizou-se o modo positivo de ionização (item 4.11.5). A Figura 33 apresenta o cromatograma obtido no modo *scan* para o extrato, com detecção no UV, ESI⁻ e ESI⁺. Os compostos foram identificados com base no padrão de fragmentação MS/MS e comparação com compostos de referência e dados da literatura (SILVEIRA et al., 2020). Os resultados obtidos revelaram a presença de friedelina, friedelinol, amirina, lupeol, ácido betulínico e ácido ursólico no extrato avaliado (Tabela 14). Estes compostos aqui identificados já foram relatados em *M. ilicifolia*.

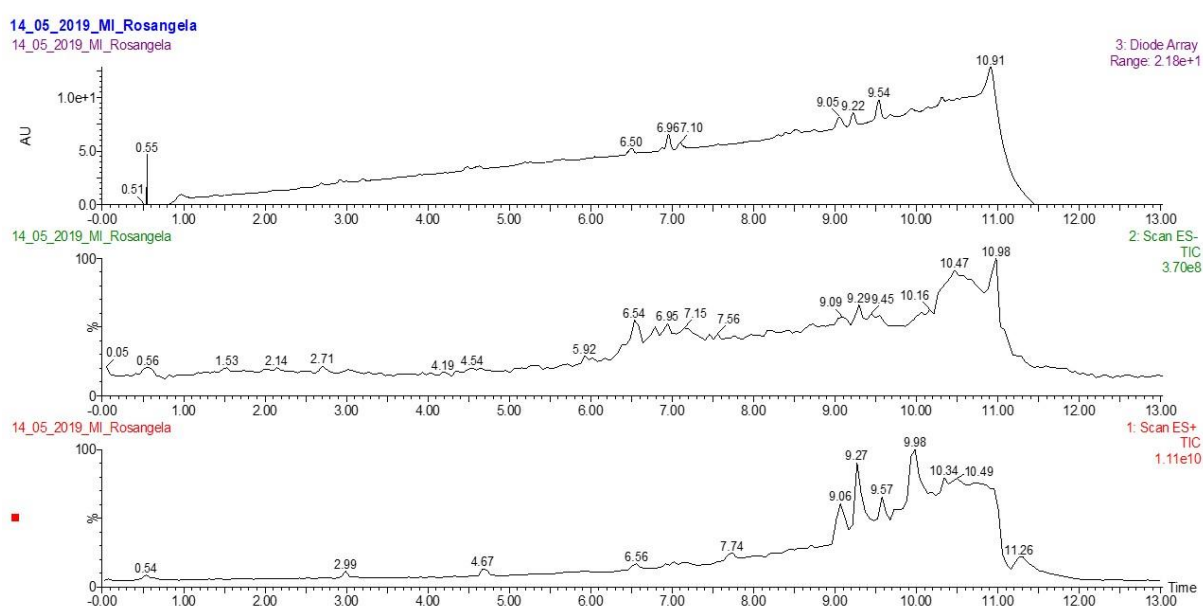


Figura 33. Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo *scan* com detecção no UV (a); ESI⁻ (b) e ESI⁺ (c) para o extrato etanólico (EE) de folhas de *M. ilicifolia* para análise do perfil exploratório. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

Tabela 14. Compostos identificados putativamente no extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia* por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no modo de ionização positivo e monitoramento de reações múltiplas (MRM) usando transições de íons específicas.

Substância	Energia de colisão (V)	Tempo de retenção (min)	[M+H] ⁺ (m/z)	Íon fragmento (m/z)
Ácido ursólico	20	10,01	457	203; 191
Ácido betulínico	15	12,20	457	393; 287
Friedelina	32	19,72	427	409; 121; 109
Friedelinol	32	11,03	429	411; 109
Lupeol	32	18,86	427	409; 137; 109
Amirina	32	22,53	427	409; 149.1; 134.9; 109

5.4.2 Identificação estrutural de constituintes de *T. glabrescens* e *M. ilicifolia* por CG-EM

Os grupos de frações resultantes do refractionamento de FrDCM A (GF74, GF85, GF94; vide Tabela 6) e de FrDCM B (GF9, GF39, GF52, GF56; vide Tabela 8) de *T. glabrescens* e do fracionamento do extrato diclorometânico de *M. ilicifolia* (GF10, GF33, GF40; vide Tabela 10) apresentaram aspecto graxo e, por isso, estas amostras foram selecionadas para análises por CG-EM. As análises revelaram tratar-se de misturas, com mais de um constituinte presente em cada amostra. Os compostos foram identificados por comparação dos índices de retenção e do espectro de massas obtido com dados das bibliotecas espectrais (NIST, FFNSC e Wiley), sendo considerado como critério de corte similaridade >85%.

A análise da composição química destas amostras revelou perfis semelhantes e os dados obtidos possibilitaram identificar 11 compostos, sendo sete ésteres, um álcool, um triterpeno e dois hidrocarbonetos (Tabelas 15, 16 e 17). A seguir é feita a descrição do procedimento empregado para identificação de um dos constituintes. Procedimento semelhante foi empregado para os identificar as demais substâncias.

Acrilato de pentadecila

Os cromatogramas de íons totais obtidos por CG-EM para as amostras GF74 e GF94 de FrDCM A e GF52 de FrDCM B apresentaram um pico com TR = 44,02 min, que foi atribuído ao acrilato de pentadecila, de fórmula molecular C₁₈H₃₄O₂ e massa molar 282,5 g/mol (Figura 34). O espectro de massas apresentou os íons fragmentos em m/z 140 [M-C₁₀H₂₂]⁺ (traços), m/z

72 [M-CH₂CHCO₂H]⁺⁺ (53%) e *m/z* 55 [CH₂CHCO]⁺⁺ (100%). Estes íons coincidiram com os dados da literatura disponíveis no NIST WebBook. A ocorrência de acrilato de pentadecila é inédita no gênero *Terminalia*. Entretanto, o acrilato de pentadecila foi identificado por CG-EM em *Maytenus emarginata* (JOSHI e WAGH, 2019), porém sua ocorrência em *M. ilicifolia* é inédita.

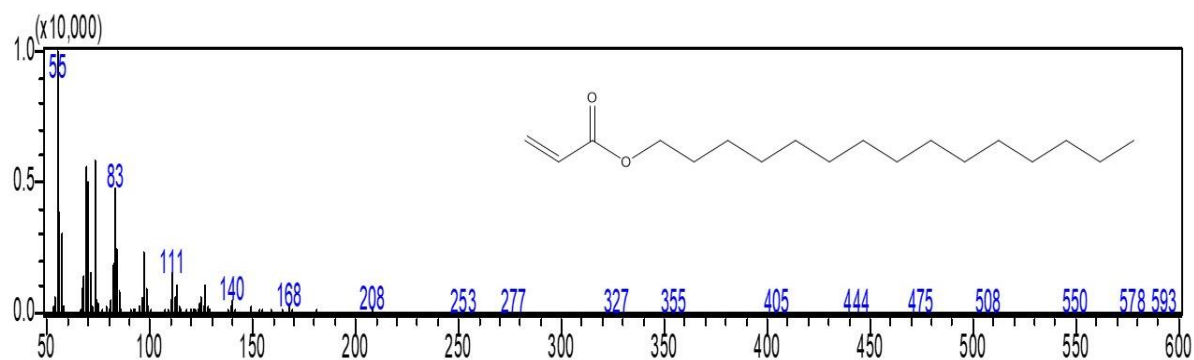


Figura 34. Espectro de massas obtido para a substância com TR = 44,02 min no cromatograma de TIC registrado para as amostras GF74 e GF94 de FrDCM A e GF52 de FrDCM B, identificado como acrilato de pentadecila.

Tabela 15. Composição química dos grupos de frações reunidas GF74, GF85, GF94 de *T. glabrescens*, identificada por CG-EM.

Amostra	Pico	TR	Área	Área (%)	Constituinte / FM / SM (%)	MM (g mol ⁻¹)	Fragmentos <i>m/z</i> / Atribuição
GF74	1	44,006	3251522	7,87	Acrilato de pentadecila / C ₁₈ H ₃₄ O ₂ / 90	282,5	140 [M-C ₁₀ H ₂₂] ⁺⁺ (traços); 72 [M-CH ₂ CHCO ₂ H] ⁺⁺ (53%); 111 [CH ₃ (CH ₂) ₆ CO] ⁺⁺ (20%) e 55 [CH ₂ CHCO] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	2	54,867	14767030	35,77	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 94	284,5	284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂)] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	3	56,736	5873670	14,22	<i>n</i> -hexadecanoato de trimetilsilila / (C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si) / 92	328,6	328 [M] ⁺⁺ (traços); 313 [M-CH ₃] ⁺⁺ (50%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M-C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 285, 257, 229, 145, 117 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
	4	60,274	6086994	14,74	Linoleato de etila / (C ₂₀ H ₃₆ O ₂) / 89	308,5	308 [M] ⁺⁺ (traços); 281 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ , 178 [CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CH-CH ₂ CH=CH ₂ -CH=CH ₂] ⁺⁺ , estabilizado por ressonância,

Tabela 15. Continuação

						151, 137, 123, 109, 95, 81, 67 = perdas sucessivas de (CH ₂) ^{a-d}
						310 [M] ⁺⁺ (1%); 281 [M-C ₂ H ₅] ⁺⁺ (1%); 111 [CH ₃ CH ₂] ₅ CH=CH] ⁺⁺ (25%); 139, 83 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂); 55 (100%) [O=C=CH] ⁺⁺ estabilizado por ressonância ^{a-d}
5	60,472	7951784	19,26	(Z)-9-octadecenoato de etila / (C ₂₀ H ₃₈ O ₂) / 89	310,5	
6	61,285	3361331	8,14	Octadecanoato de etila / (C ₂₀ H ₄₀ O ₂) / 90	312,5	312 [M ⁺] (3%); 269 [M-C ₃ H ₇] ⁺⁺ (7%); 157 [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺⁺ (12%); 88 [CH ₃ COOCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
1	54,905	18053561	15,51	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 95	284,5	284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂)] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
GF85						310 [M] ⁺⁺ (1%); 281 [M-C ₂ H ₅] ⁺⁺ (1%); 111 [CH ₃ CH ₂] ₅ CH=CH] ⁺⁺ (25%); 139, 83 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂); 55 (100%) [O=C=CH] ⁺⁺ estabilizado por ressonância ^{a-d}
2	60,556	61726317	53,03	(Z)-9-octadecenoato de etila / (C ₂₀ H ₃₈ O ₂) / 91	310,5	

Tabela 15. Continuação

GF94	1	44,024	2605439	10,22	Acrilato de pentadecila / (C ₁₈ H ₃₄ O ₂) / 90	282,5	140 [M-C ₁₀ H ₂₂] ⁺⁺ (traços); 72 [M-CH ₂ CHCO ₂ H] ⁺⁺ (53%); 111 [CH ₃ (CH ₂) ₆ CO] ⁺⁺ (20%) e 55 [CH ₂ CHCO] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	2	54,878	7847783	30,78	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 93	284,5	284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂)] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	3	56,751	5025581	19,71	<i>n</i> -hexadecanoato de trimetilsilila / (C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si) / 91	328,6	328 [M] ⁺⁺ (traços); 313 [M-CH ₃] ⁺⁺ (50%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M-C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 285, 257, 229, 145, 117 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
	4	60,489	7241402	28,40	(<i>Z</i>)-9-octadecenoato de etila / (C ₂₀ H ₃₈ O ₂) / 89	310,5	310 [M] ⁺⁺ (1%); 281 [M-C ₂ H ₅] ⁺⁺ (1%); 111 [CH ₃ CH ₂) ₅ CH=CH] ⁺⁺ (25%); 139, 83 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂); 55 (100%) [O=C=CH] ⁺⁺ estabilizado por ressonância ^{a-d}

Legenda: TR = Tempo de retenção; FM = Fórmula molecular; %SM = Porcentagem de similaridade com compostos disponíveis em bibliotecas espectrais; MM = Massa molecular. a: PAVIA et al., 1979; b: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-ms-3.html>; c: https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/methesters/me-hydroxy-2/index.htm; d: <https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/mass-spectra>; e: SUSIDARTI et al. 2007.

Tabela 16. Composição química dos grupos de frações reunidas GF9, GF39, GF52, GF56 de *T. glabrescens*, identificada por CG-EM.

Amostra	Pico	TR	Área	Área (%)	Constituinte / FM / SM (%)	MM (g mol ⁻¹)	Fragmentos <i>m/z</i> / Atribuição
GF9	1	44,020	3072433	13,21	1-Dodecanol / (C ₁₂ H ₂₆ O) / 89	186,3	171 [M-CH ₃] ⁺⁺ (traços); 168 [M-H ₂ O] ⁺⁺ (1%); 140 [M-H ₂ O - CH ₂ CH ₂] ⁺⁺ [Rearranjo McLafferty] (traços); 139, 111, 83, 55 (100%) = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) a-d
	2	54,881	6943256	29,86	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 94	284,5	284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂) ⁺⁺ (100%) a-d
	3	56,734	3155958	13,57	<i>n</i> -hexadecanoato de trimetilsilila / (C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si) / 93	328,6	328 [M] ⁺⁺ (traços); 313 [M-CH ₃] ⁺⁺ (50%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M-C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 285, 257, 229, 145, 117 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) a-d
	4	60,487	3325338	14,30	(<i>Z</i>)-9-octadecenoato de etila / (C ₂₀ H ₃₈ O ₂) / 90	310,5	310 [M] ⁺⁺ (1%); 281 [M-C ₂ H ₅] ⁺⁺ (1%); 111 [CH ₃ CH ₂] ₅ CH=CH] ⁺⁺ (25%); 139, 83

Tabela 16. Continuação

							= Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂); 55 (100%) [O=C=CH] ⁺⁺ estabilizado por ressonância ^{a-d}
	5	61,308	3669484	15,78	Octadecanoato de etila / (C ₂₀ H ₄₀ O ₂) / 92	312,5	312 [M ⁺⁺] (3%); 269 [M-C ₃ H ₇] ⁺⁺ (7%); 157 [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺⁺ (12%); 88 [CH ₃ COOCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	6	62,938	3088091	13,28	Octadecanoato de trimetilsilila / (C ₂₁ H ₄₄ O ₂) / 86	356,7	357 [M] ⁺⁺ (traços); 341 [M-CH ₃] ⁺⁺ (70%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M-C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 313, 285, 257, 229, 145 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
GF39	1	76,061	51866720	88,74	Friedelan-3-ona / (C ₃₀ H ₅₀ O) / 86	426,7	426 [M] ⁺⁺ (12%); 411 [M-C ₁ H ₃] ⁺⁺ (5%); 344 (Clivagem no anel A); 273 (Clivagem no anel B) (20%); 207 (Clivagem no anel E) (48%); 123 (Clivagem no anel D) (53%) ^e
GF52	1	44,028	2001772	1,70	Acrilato de pentadecila / (C ₁₈ H ₃₄ O ₂) / 90	282,5	140 [M-C ₁₀ H ₂₂] ⁺⁺ (traços); 72 [M-CH ₂ CHCO ₂ H] ⁺⁺ (53%); 111 [CH ₃ (CH ₂) ₆ CO] ⁺⁺ (20%) e 55 [CH ₂ CHCO] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}

Tabela 16. Continuação

	2	54,879	2137874	1,81	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 94	284,5	284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂) ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	3	61,304	1645411	1,39	Octadecanoato de etila / (C ₂₀ H ₄₀ O ₂) / 92	312,5	312 [M] ⁺⁺ (3%); 269 [M-C ₃ H ₇] ⁺⁺ (7%); 157 [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺⁺ (12%); 88 [CH ₃ COOCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	4	76,357	64185957	54,39	Friedelan-3-ona / (C ₃₀ H ₅₀ O) / 90	426,7	426 [M] ⁺⁺ (12%); 411 [M-C ₁ H ₃] ⁺⁺ (5%); 344 (Clivagem no anel A); 273 (Clivagem no anel B) (20%); 207 (Clivagem no anel E) (48%); 123 (Clivagem no anel D) (53%) e
GF56	1	54,874	2859205	19,92	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 93	284,5	284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂) ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	2	56,746	4161358	28,99	<i>n</i> -hexadecanoato de trimetilsilila / (C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si) / 92	328,6	328 [M] ⁺⁺ (traços); 313 [M-CH ₃] ⁺⁺ (50%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M-

Tabela 16. Continuação

3	61,302	2247716	15,66	Octadecanoato de etila / (C ₂₀ H ₄₀ O ₂) / 91	312,5	C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 285, 257, 229, 145, 117 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d} 312 [M ⁺] (3%); 269 [M-C ₃ H ₇] ⁺⁺ (7%); 157 [M-C ₁₁ H ₂₃] ⁺⁺ (12%); 88 [CH ₃ COOCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
4	62,936	3582914	24,97	Octadecanoato de trimetilsilila / (C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si) / 86	356,7	357 [M] ⁺⁺ (traços); 341 [M-CH ₃] ⁺⁺ (70%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M- C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 313, 285, 257, 229, 145 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}

Legenda: TR = Tempo de retenção; FM = Fórmula molecular; %SM = Porcentagem de similaridade com compostos disponíveis em bibliotecas espectrais; MM = Massa molecular. a: PAVIA et al., 1979; b: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-ms-3.html>; c: https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/methesters/me-hydroxy-2/index.htm; d: <https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/mass-spectra>; e: SUSIDARTI et al. 2007.

Tabela 17. Composição química dos grupos de frações reunidas GF10, GF33, GF40 de *M. ilicifolia*, identificada por CG-EM.

Amostra	Pico	TR	Área	Área (%)	Constituinte / FM / SM (%)	MM (g mol ⁻¹)	Fragmentos <i>m/z</i> (%) / Atribuição
GF10	1	44,019	4529817	11,81	1-Dodecanol / (C ₁₂ H ₂₆ O) / 90	186,3	171 [M-CH ₃] ⁺ (traços); 168 [M-H ₂ O] ⁺ (1%); 140 [M-H ₂ O-CH ₂ CH ₂] ⁺ [Rearranjo McLafferty] (traços); 139, 111, 83, 55 (100%) = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
	2	46,319	5023079	13,10	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 90	284,5	284 [M] ⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂)] ⁺ (100%) ^{a-d}
	3	88,364	4362994	11,38	Pentatriacontano / (C ₃₅ H ₇₂) / 92	492,9	421 (traços) [M-C ₅ H ₁₁] ⁺ , 113 ([M-C ₂₇ H ₅₅]) ⁺ (20%); 85 ([M-C ₂₉ H ₅₉]) ⁺ (80%); 71 ([M-C ₃₀ H ₆₁]) ⁺ (100%) O íon molecular é visto como um pequeno pico em <i>m/z</i> = 492,9 g/mol. Fragmentos que diferem por 14

Tabela 17. Continuação

						unidades de massa, formados pela clivagem de unidades -CH ₂ , $m/z = 113, 99, 85, 71$ ([M-C ₃₀ H ₆₁]) ⁺⁺ (100%), 57, 43 ^{a-d}
	4	99,628	10818798	28,22	Hexacosano / (C ₂₆ H ₅₄) / 94	366,7 365, 337, 309, 281, 253, 225, 197, 169, 141, 113, 85, 71 (100%), 57 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
	1	44,026	1623695	5,60	1-Dodecanol / (C ₁₂ H ₂₆ O) / 90	186,3 171 [M-CH ₃] ⁺⁺ (traços); 168 [M-H ₂ O] ⁺⁺ (1%); 140 [M-H ₂ O - CH ₂ CH ₂] ⁺⁺ [Rearranjo McLafferty] (traços); 139, 111, 83, 55 (100%) = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
GF33	2	54,879	4729454	16,31	<i>n</i> -hexadecanoato de etila / (C ₁₈ H ₃₆ O ₂) / 93	284,5 284 [M] ⁺⁺ (3%); 255 [M-CH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (traços); 241 [M-CH ₃ CH ₂ OH] ⁺⁺ (7%); 101 [M-CH ₂ CHCOH-OCH ₂ CH ₃] ⁺⁺ (48%); 88 [Acetato de etila (C ₄ H ₈ O ₂)] ⁺⁺ (100%) ^{a-d}
	3	56,749	2488975	8,59	<i>n</i> -hexadecanoato de trimetilsilila / (C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si) / 90	328,6 328 (traços) [M] ⁺⁺ , 313 [M-CH ₃] ⁺⁺ (50%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺⁺ (80%); 73 [M-C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺⁺ (100%); 285, 257,

Tabela 17. Continuação

						229, 145, 117 = Perdas sucessivas de $(\text{CH}_2\text{CH}_2)^{\text{a-d}}$
						308 $[\text{M}]^{+\bullet}$ (traços); 281 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CH}_3]^{+\bullet}$, 178 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2]^{+\bullet}$, estabilizado por ressonância, 151, 137, 123, 109, 95, 81, 67 = perdas sucessivas de $(\text{CH}_2)^{\text{a-d}}$
	4	60,301	8353897	28,82	Linoleato de etila / $(\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2)$ / 91	308,5
	5	60,490	3710555	12,80	(Z)-9-octadecenoato de etila / $(\text{C}_{20}\text{H}_{38}\text{O}_2)$ / 91	310,5
	6	61,306	2773202	9,57	Octadecanoato de etila / $(\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2)$ / 92	312,5
						310 $[\text{M}]^{+\bullet}$ (1%); 281 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^{+\bullet}$ (1%); 111 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}]^{+\bullet}$ (25%); 139, 83 = Perdas sucessivas de (CH_2CH_2) ; 55 (100%) $[\text{O}=\text{C}=\text{CH}]^{+\bullet}$ estabilizado por ressonância ^{a-d}
						312 $[\text{M}^{+\bullet}]$ (3%); 269 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^{+\bullet}$ (7%); 157 $[\text{M}-\text{C}_{11}\text{H}_{23}]^{+\bullet}$ (12%); 88 $[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3]^{+\bullet}$ (100%) ^{a-d}
GF40	1	44,032	2705616	14,20	1-Dodecanol / $(\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O})$ / 90	186,3
						171 $[\text{M}-\text{CH}_3]^{+\bullet}$ (traços); 168 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^{+\bullet}$ (1%); 140 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2]^{+\bullet}$ [Rearranjo McLafferty]

Tabela 17. Continuação

						(traços); 139, 111, 83, 55 (100%) = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}
2	56,755	1182259	6,20	<i>n</i> -hexadecanoato de trimetilsilila / (C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si) / 92	328,6	328 [M] ⁺ (traços); 313 [M-CH ₃] ⁺ (50%); 117 [M-C ₁₇ H ₃₆] ⁺ (80%); 73 [M-C ₁₈ H ₃₆ O ₂] ⁺ (100%); 285, 257, 229, 145, 117 = Perdas sucessivas de (CH ₂ CH ₂) ^{a-d}

Legenda: TR = Tempo de retenção; FM = Fórmula molecular; %SM = Porcentagem de similaridade com compostos disponíveis em bibliotecas espectrais; MM = Massa molecular. a: PAVIA et al., 1979; b: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-ms-3.html>; c: https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/ms/methesters/me-hydroxy-2/index.htm; d: <https://www.sciencedirect.com/topics/physics-and-astronomy/mass-spectra>; e: SUSIDARTI et al., 2007.

Hexadecanoato de etila foi identificado por CG-EM em *T. arjuna* (GOMATHY e RATHINAM, 2017), porém este relato é inédito em *T. glabrescens*, bem como para o gênero *Maytenus*. A ocorrência de friedelan-3-ona em *T. glabrescens* foi anteriormente relatada (GARCEZ et al., 2003), sendo também identificada no extrato diclorometânico de *M. ilicifolia* por UPLC-DAD-ESI-MS/MS (seção 5.4.1.2). Já os constituintes ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, linoleato de etila, octadecanoato de etila, *Z*-9-octadecenoato de etila, 1-dodecanol, pentatriacontano e hexacosano são inéditos nos gêneros *Terminalia* e *Maytenus*. As estruturas químicas dos compostos identificados estão representadas na Figura 35.

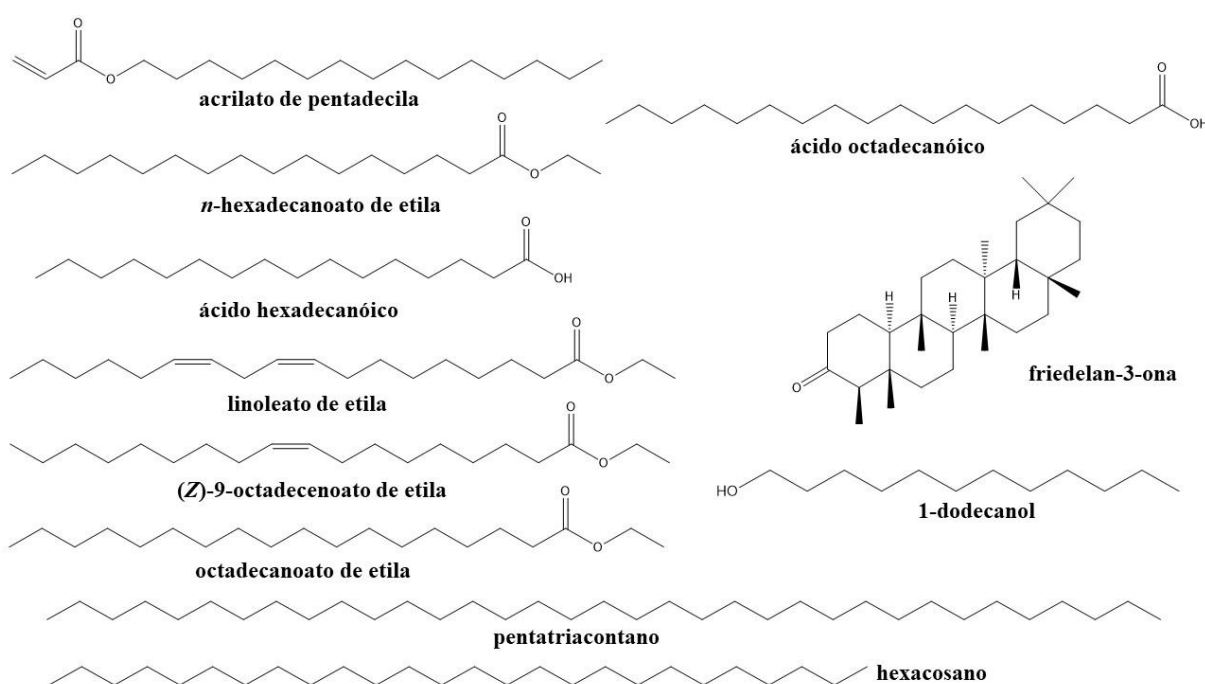


Figura 35. Compostos identificados em *T. glabrescens* e *M. ilicifolia* por CG-EM.

5.4.3 Identificação estrutural dos sólidos isolados de *T. glabrescens*

O refração da fração diclorometânica de *T. glabrescens* por cromatografia em coluna de sílica gel *flash* resultou na obtenção de três sólidos GF154, GF195 e GF231 (item 4.11.3.1.1). A análise desses sólidos por CCD de sílica gel 60 indicou manchas únicas, de coloração rosa (GF154, GF195) ou azulada (GF231) após revelação com anisaldeído/ácido sulfúrico, sugerindo tratar-se de terpenos (GERLACH et al., 2018). A identificação estrutural das substâncias isoladas foi realizada a partir da análise de espectros de RMN e espectros de massas.

5.4.3.1 GF154

GF154 foi obtido como um sólido branco, com faixa de fusão de 164 a 167 °C. Os cromatogramas obtidos para GF154 (ESI no modo positivo e negativo) estão representados na Figura 36. O espectro no DAD registrado para GF154 apresentou máximo de absorção no comprimento de onda de 225,9 nm, atribuído a fase móvel utilizada (Figura 37). O espectro de massas no modo positivo de ionização não apresentou o pico do íon molecular, mas apresentou o pico base em m/z 409 atribuído a $[M+H-H_2O]^+$, sugerindo que o composto possua fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$ e massa molecular 426,7 g/mol (Figura 37).

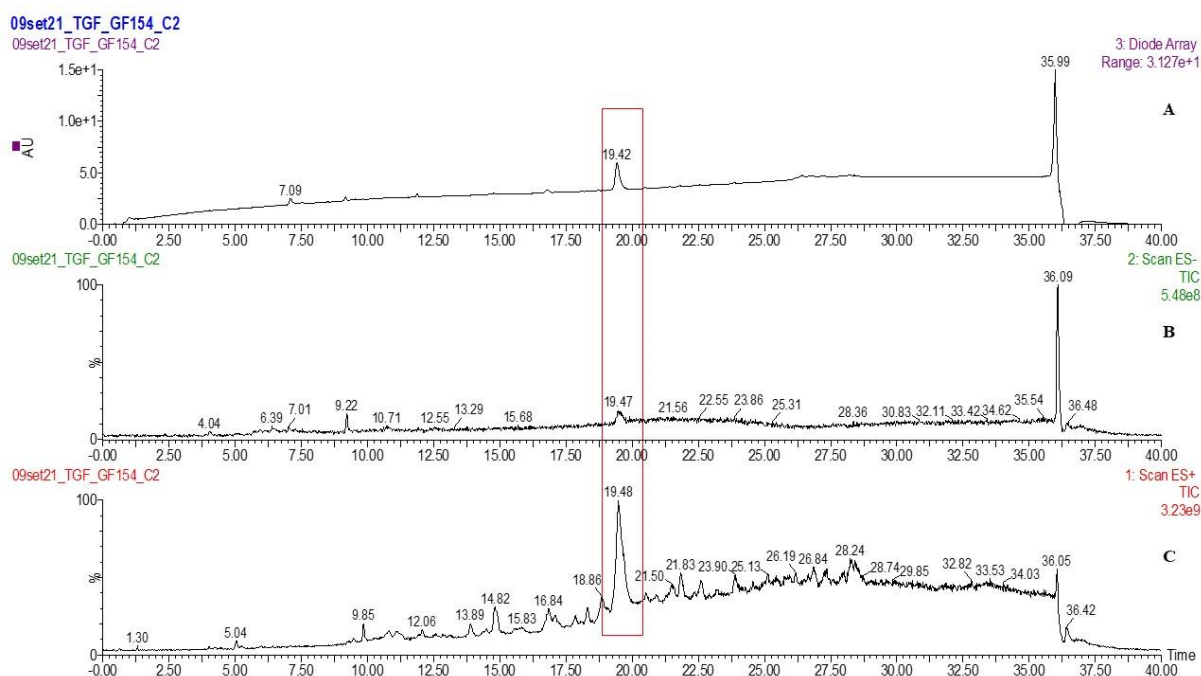


Figura 36. Cromatogramas obtidos por UPLC-DAD-ESI-MS para GF154 com detecção no DAD (A), TIC ESI⁻ (B) e TIC ESI⁺ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

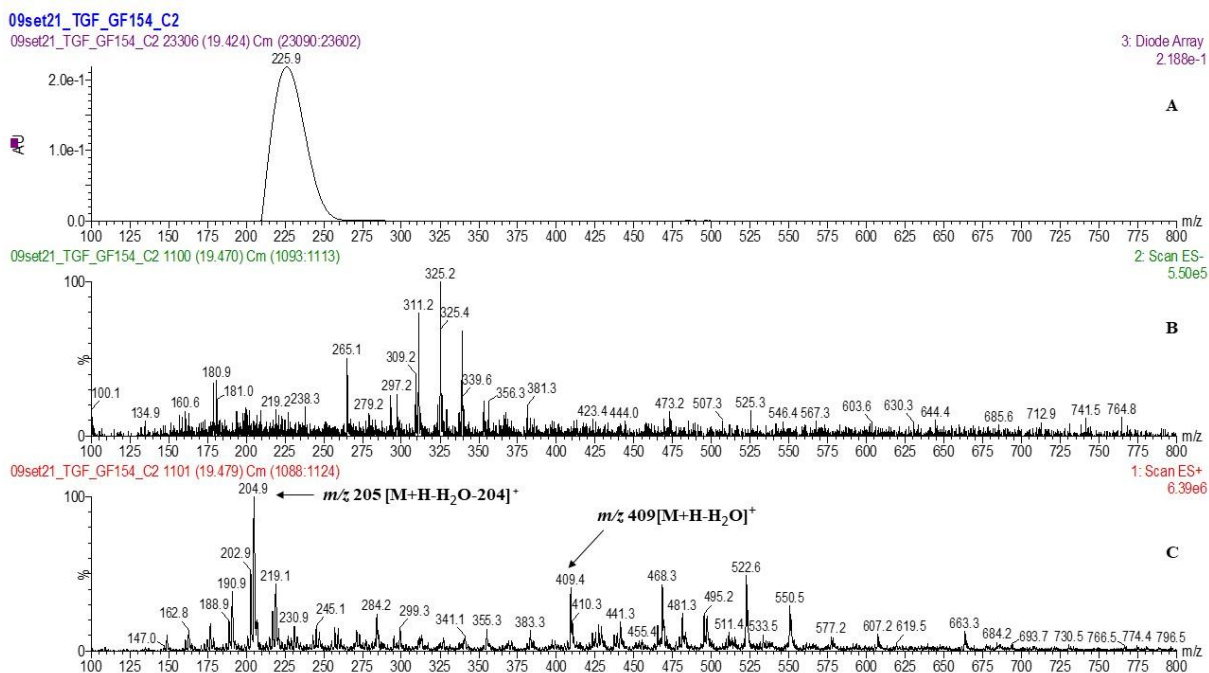


Figura 37. Espectros no UV (A) e de massas obtido para GF154 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, no modo de ionização positivo ESI⁺ (B) e negativo ESI⁻ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

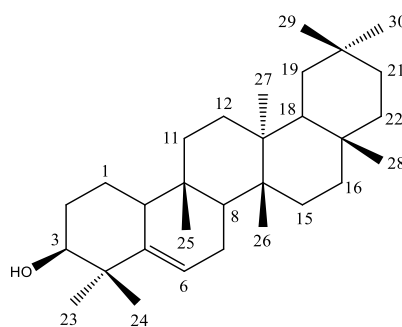
No espectro de RMN de ¹³C (Figura 38) foram observados 30 sinais de carbonos, condizente com um esqueleto estrutural de triterpeno. A multiplicidade dos sinais, apurada pelo subspectro DEPT-135 (Figura 39) indicou oito carbonos metílicos, dez carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e sete carbonos não hidrogenados, os quais foram confirmados pela análise do mapa de contornos HSQC. Por sua vez, a análise do espectro de RMN de ¹H indicou a presença de hidrogênio olefínico ($\delta\ 5,63$) e de um hidrogênio metínico ($\delta\ 3,47$) ligado a carbono carbinólico. Os dados obtidos sugeriram tratar-se de um triterpeno da classe dos glutinanos.

A partir do esqueleto básico dos glutinanos iniciou-se a atribuição dos sinais do espectro de RMN de ¹³C. Os sinais em $\delta\ 122,07$ e $\delta\ 141,62$, foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-6 e C-5, enquanto o sinal em $\delta\ 76,34$ foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. Além dos 30 sinais de carbono, um sinal em $\delta\ 29,70$ foi observado no espectro de RMN de ¹³C. A análise do mapa de contornos HMBC indicou que este sinal não se correlacionava com os hidrogênios da molécula e se tratava de grupos metilênicos de constituintes graxos (Figura 40), ou seja, uma impureza da amostra.

A confirmação da localização da dupla ligação no esqueleto do triterpeno foi definida pela análise do mapa de contornos HMBC (Figura 41), a partir das correlações do sinal do hidrogênio olefínico H-6 em δ 5,63 (m) com os sinais atribuídos aos carbonos C-4 (δ 40,83), C-7 (δ 23,64), C-8 (δ 47,44) e C-10 (δ 49,70). Dessa forma, a localização da insaturação foi definida como sendo entre C5 e C6. Com isso, foi possível concluir que a posição C-4 (δ 40,83) refere-se a um carbono quarternário, visto que esse sinal não aparece no DEPT-135. A definição da localização da hidroxila foi feita a partir da correlação do hidrogênio metínico H-3 (δ 3,47, dd, $J = 2,70$ e $3,1$ Hz) com o carbono C-1 (δ 18,21).

As atribuições dos valores de deslocamentos de RMN de ^{13}C e de DEPT-135 foram comparados com os valores descritos na literatura para o glutinol e estão listados na Tabela 18.

No espectro de RMN de ^1H de GF154 (Figura 42), o sinal em δ 5,63 (m, 1H) foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e o sinal em δ 3,47 (dd, $J = 2,70$ e $3,1$ Hz, 1H) foi atribuído ao hidrogênio metínico H-3. Oito sinais de simpletos em δ 0,85 (H-25), δ 0,95 (H-29), δ 0,99 (H-30), δ 1,00 (H-27), δ 1,04 (H-23), δ 1,09 (H-26), δ 1,14 (H-24) e δ 1,16 (H-28) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos. Na Tabela 19 estão dispostos os valores de deslocamento químico atribuídos. Com base nos experimentos de RMN uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura, a substância GF154 foi identificada como glutinol.



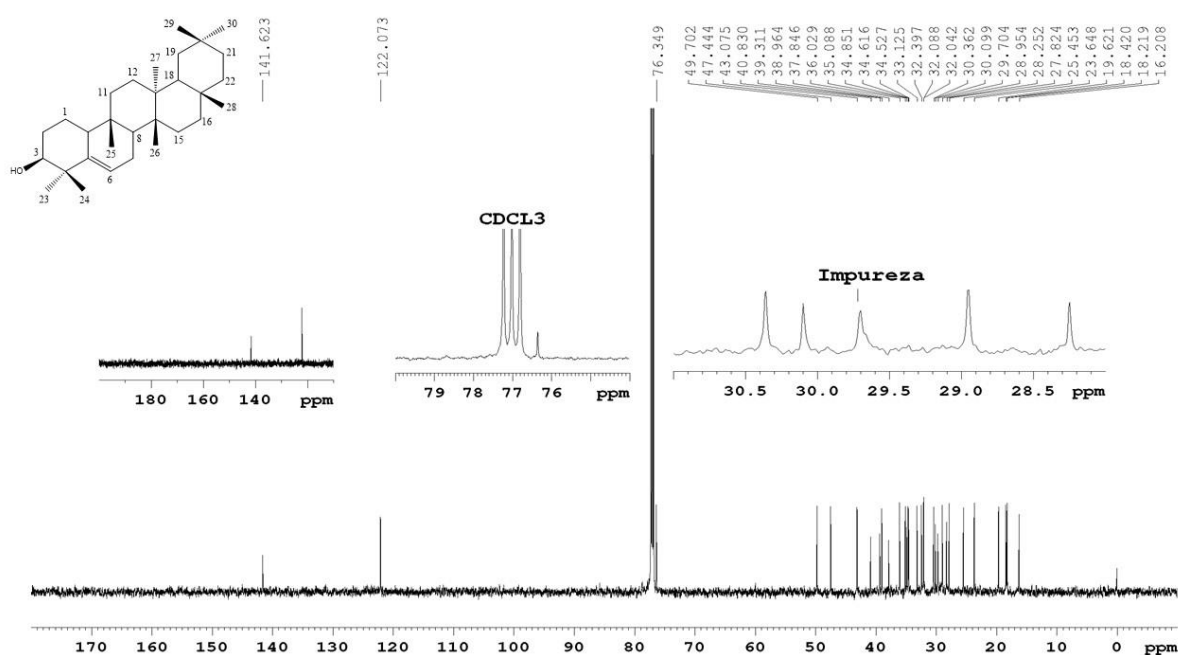


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para GF154 (CDCl_3 , 150 MHz).

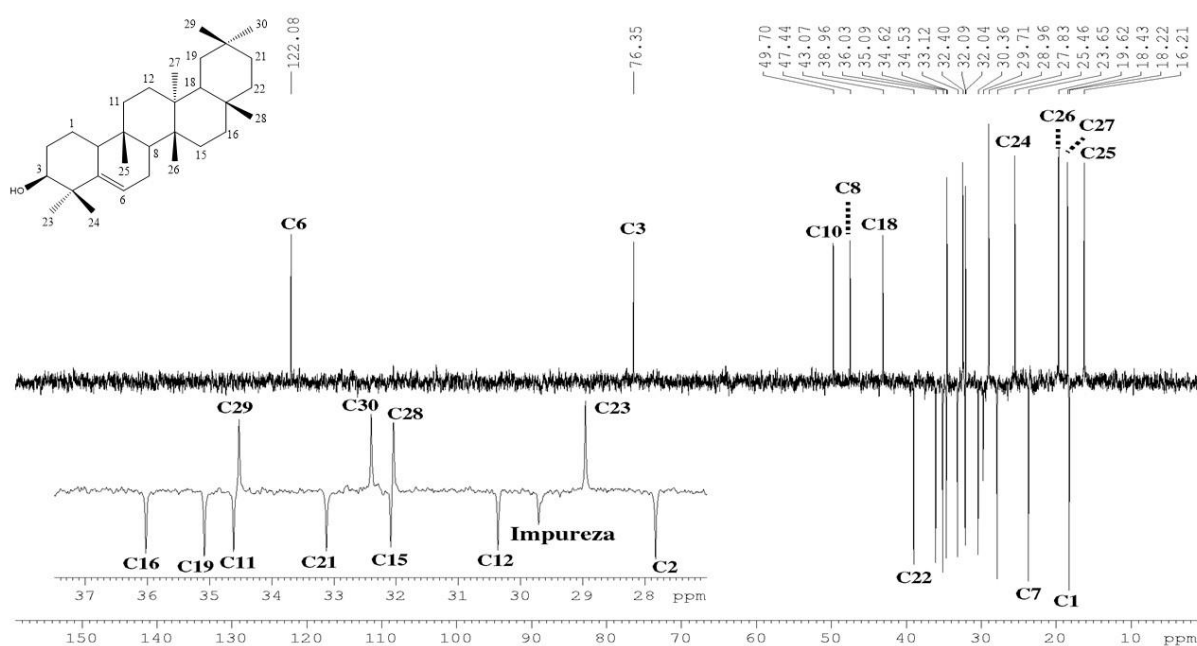


Figura 39. Subespectro de DEPT-135 obtido para GF154 (CDCl_3 , 150 MHz).

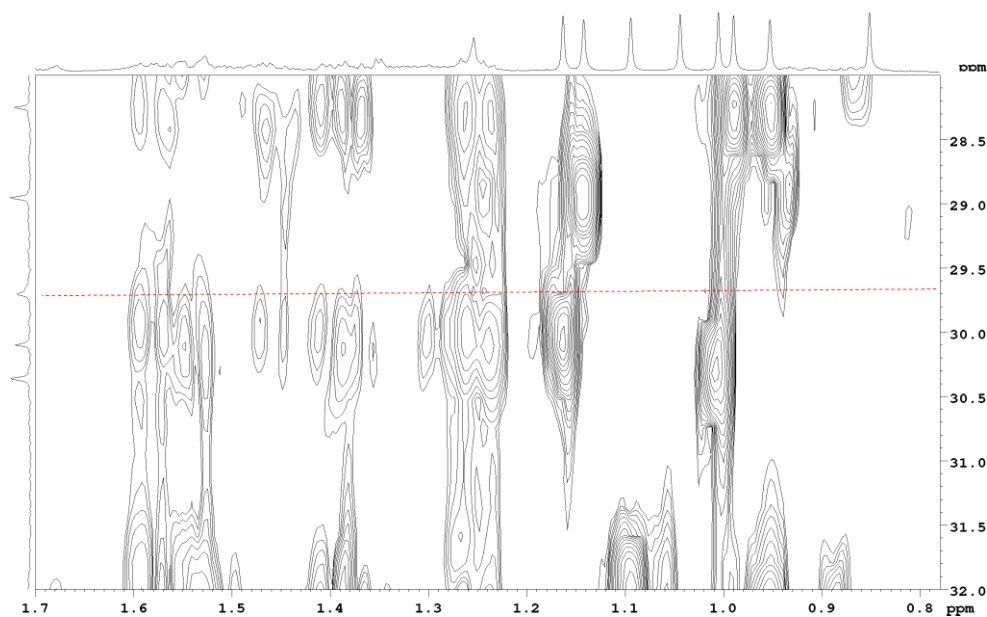


Figura 40. Expansão do mapa de contornos HMBC na região do sinal em δ 29,70 referente a impureza, observado no espectro obtido para GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

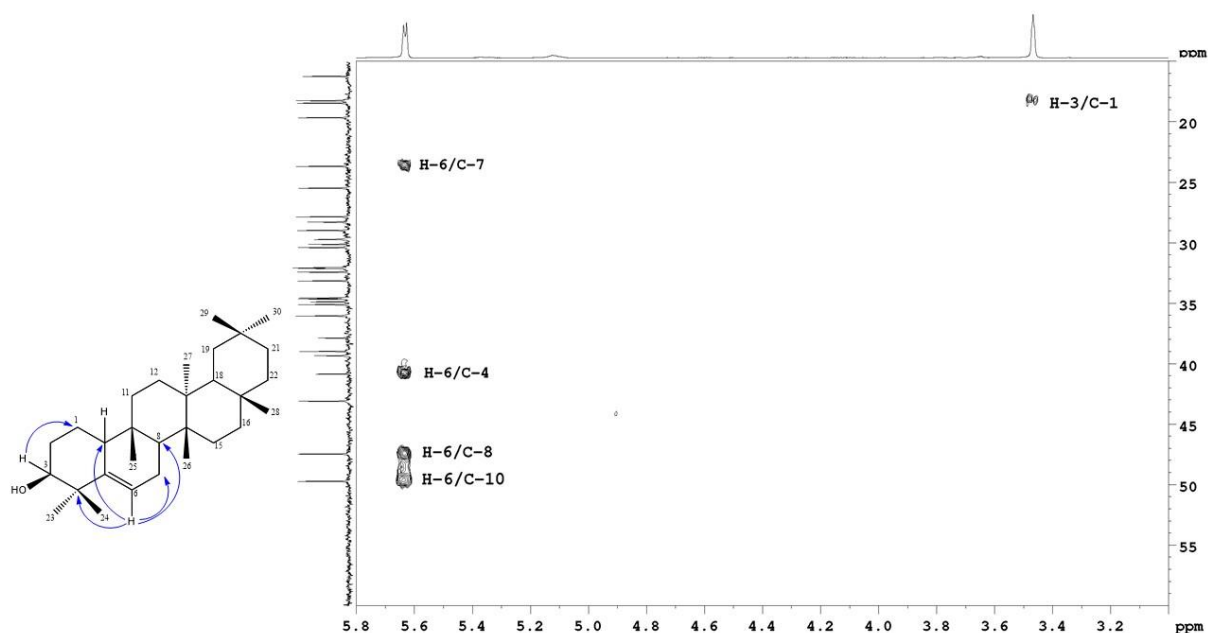


Figura 41. Expansão do mapa de contornos HMBC indicando manchas de correlação entre H-6 e os carbonos C-4, C-7, C-8 e C-10 e H-3 com C-1 para GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

Tabela 18. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C atribuídos para GF154 (CDCl_3 , 150 MHz) e comparação com dados da literatura relatados para o glutinol (CDCl_3 , 75 MHz).

RMN de ^{13}C			
Carbono	GF154 δ (ppm)	Multiplicidade	Glutinol (Fraga et al., 2003) δ (ppm)
1	18,2	CH_2	18,2
2	27,8	CH_2	27,8
3	76,3	CH	76,3
4	40,8	C	40,8
5	141,6	C	141,6
6	122,0	CH	122,0
7	23,6	CH_2	23,6
8	47,4	CH	47,4
9	34,8	C	34,8
10	49,7	CH	49,6
11	34,6	CH_2	34,6
12	30,3	CH_2	30,3
13	39,3	C	39,3
14	37,8	C	37,8
15	32,08	CH_2	32,1
16	36,0	CH_2	36,0
17	30,0	C	30,1
18	43,0	CH	43,0
19	35,0	CH_2	34,8
20	28,2	C	20,2
21	33,1	CH_2	33,1
22	38,9	CH_2	38,9
23	28,9	CH_3	28,9
24	25,4	CH_3	25,5
25	16,2	CH_3	16,2
26	19,6	CH_3	19,6

Tabela 18. Continuação

27	18,4	CH ₃	18,4
28	32,04	CH ₃	32,1
29	34,5	CH ₃	34,5
30	32,3	CH ₃	32,1

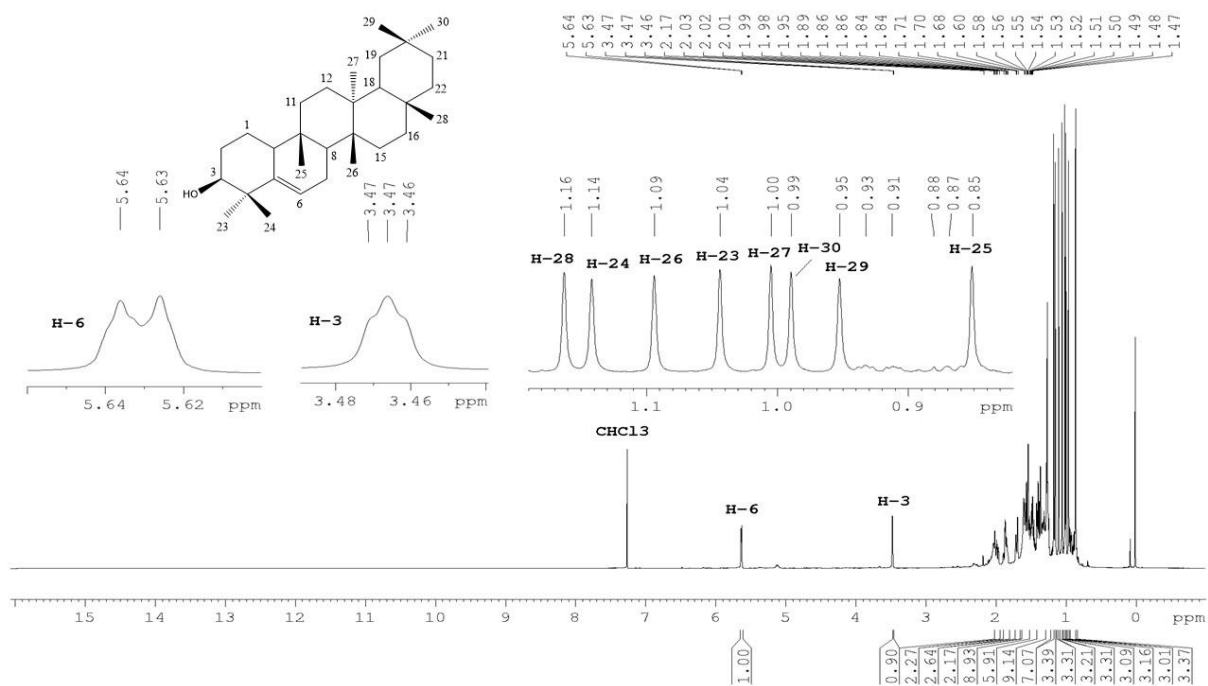
Figura 42. Espectro de RMN de ¹H de GF154 (CDCl₃, 600 MHz).

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) e do mapa de contornos HSQC obtidos para GF154 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C) e comparação com dados da literatura para o glutinol (CDCl_3 , 300 MHz).

RMN de ^1H		
H	GF154 δ (ppm)	Glutinol (Tanaka et al., 1996) δ (ppm)
1	1,48a / 1,55b	-
2	1,69a / 1,86b	-
3	3,47 (dd, $J = 2,70$ e $3,1$ Hz)	3,47 (t, $J = 3,1$ Hz)
6	5,63 (m)	5,63 (d, $J = 5,9$ Hz)
7	1,84a / 1,98b	-
8	1,52	-
10	2,02	-
11	1,40a / 1,54b	-
12	1,34a / 1,40b	-
15	1,30a / 1,47b	-
16	1,38a / 1,54b	-
18	1,58	-
19	1,38a / 1,58b	-
21	1,46a / 1,55b	-
22	1,55a / 157b	-
23	1,04 (s)	1,04 (s)
24	1,14 (s)	1,14 (s)
25	0,85 (s)	0,85 (s)
26	1,09 (s)	1,09 (s)
27	1,00 (s)	1,00 (s)
28	1,16 (s)	1,16 (s)
29	0,95 (s)	0,95 (s)
30	0,99 (s)	0,99 (s)

Legenda: a = alfa; b = beta; m = (multipeto).

A confirmação da atribuição de alguns sinais foi feita por meio da análise dos mapas de contornos COSY e HMBC. Assim, as atribuições dos hidrogênios H-2 e H-7 foram confirmadas no mapa de contornos COSY com base na correlação do sinal de H-3 (δ 3,46) com H-2 (δ 1,69 / 1,86) e do sinal de H-6 (δ 5,64) com H-7 (δ 1,84 / 1,98), indicadas na figura 43.

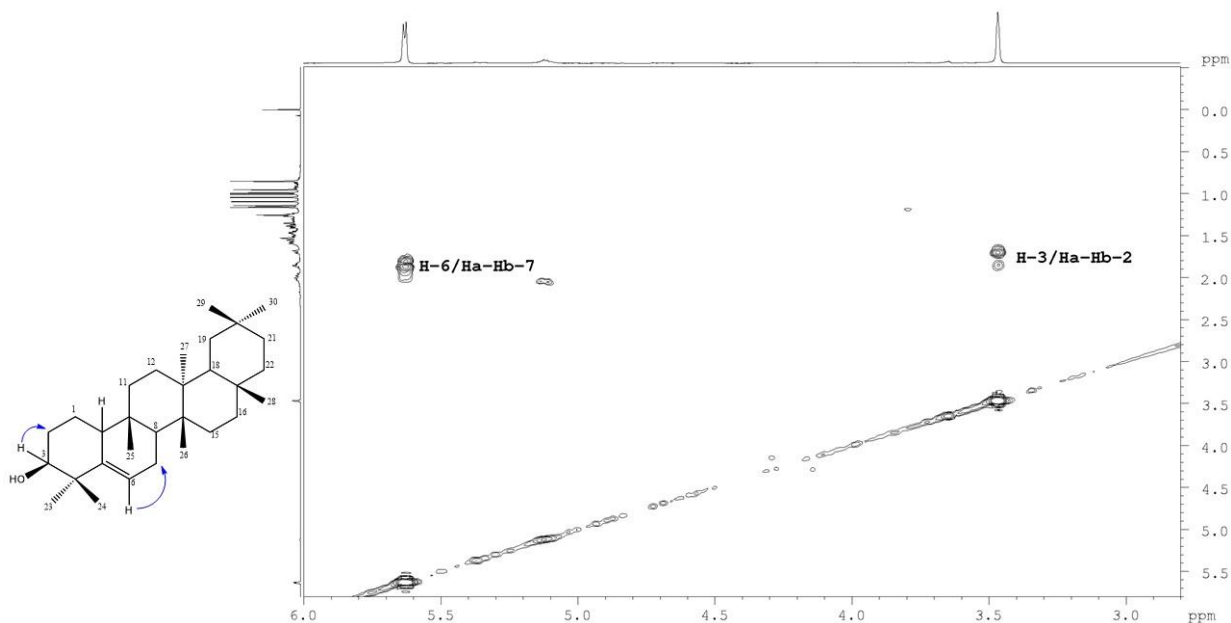


Figura 43. Expansão do mapa de contornos COSY obtido para GF154 (CDCl_3 , 600 MHz).

Conforme representado na Figura 44, os sinais em δ 1,84 e 1,98 atribuídos aos hidrogênios metilênico H7a e H7b, respectivamente, apresentam manchas de correlação com o carbono quarternário C-5 (δ 141,62) e com o carbono olefínico C-6 (δ 122,07). O sinal em δ 1,04 atribuído aos hidrogênios metílicos H-23 correlaciona-se com os sinais dos carbonos C-3 (δ 76,34) e C-5 (δ 141,62). Por sua vez, o sinal em δ 1,14 atribuído aos hidrogênios metílicos H-24 apresenta manchas de correlação com C-3 (δ 76,34), C-5 (δ 141,62) e C-6 (δ 122,07). De maneira semelhante, o sinal dos hidrogênios metílicos H-23 (δ 1,04) apresentou correlações com C-3 (δ 76,34) e C-5 (δ 141,62). Esses dados confirmam a ligação dos grupos metila C23 e C24 ao carbono quarternário C-4. As correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas estão dispostas na Tabela 20.

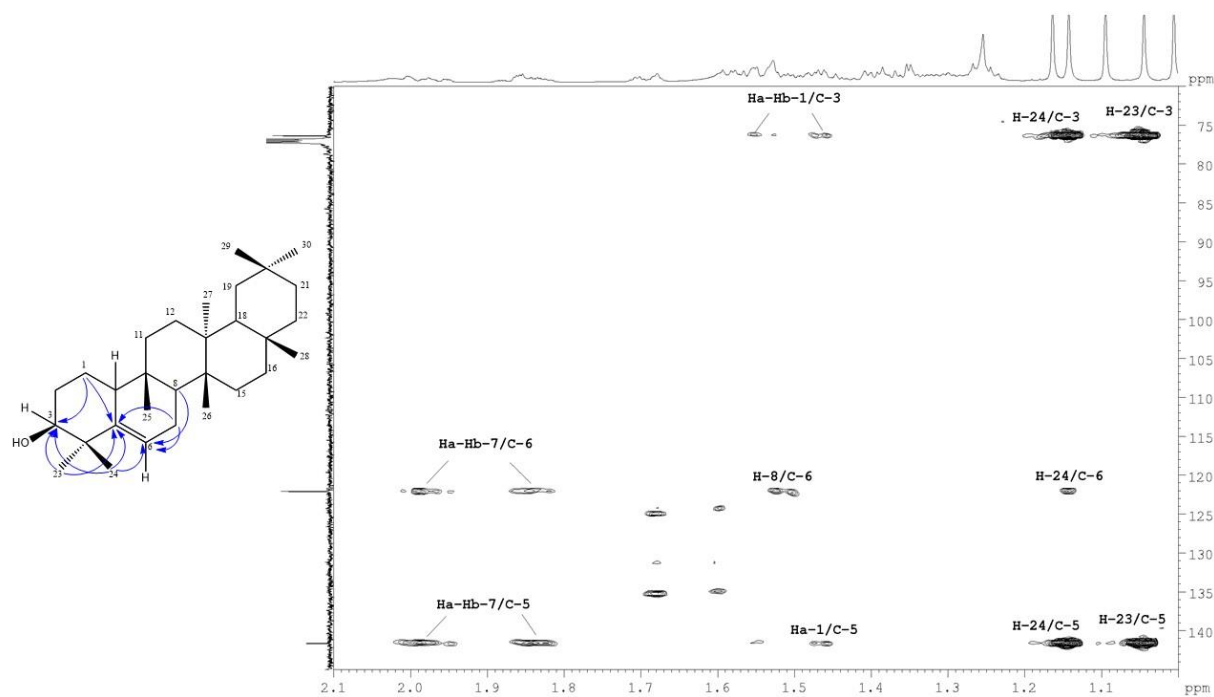


Figura 44. Expansão do mapa de contornos HMBC obtido para GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

Tabela 20. Correlações heteronucleares observadas do mapa de contornos HMBC obtido para GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

Manchas de correlação observadas	
Carbono	Hidrogênios
1	Hb-1; Hb-2
2	Hb-1
3	Ha-Hb-1; H-23; H-24
4	H-6; H-23; H-24
5	Ha-Hb-7; Ha-1; H-23; H-24
6	Ha-Hb-7; H-8; H-24
7	H-6; H-8
8	H-6; Ha-Hb-7; H-25; H-26
9	Ha-7; H-8; H-25
10	H-6; H-8; Hb-11; H-25
11	Ha-Hb-12
12	Hb-11; H-27

Tabela 20. Continuação

13	Ha-16; H-26; H-27
14	H-8; Ha-12; Hb-15; Ha-16; H-26; H-27
15	Ha-Hb-16; H-26
16	Hb-15; H-28
17	Ha-16; Hb-22; H-28
18	Hb-12; Ha-16; Ha-19; H-27; H-28
19	H-29; H-30
20	Hb-19; Ha-Hb-21; H-29; H-30
21	Ha-22; H-29; H-30
22	H-18; Hb-21; H-28
23	H-24
24	H-23
25	H-8; Ha-11
26	H-8; Hb-15
27	Ha-12; H-18
28	H-18; Hb-22

A identificação de GF154 como sendo glutinol foi confirmada pelos dados do espectro de massas representado na Figura 37. A partir da análise deste espectro foi feita a proposta de fragmentação do glutinol (GF154) representada na Figura 45.

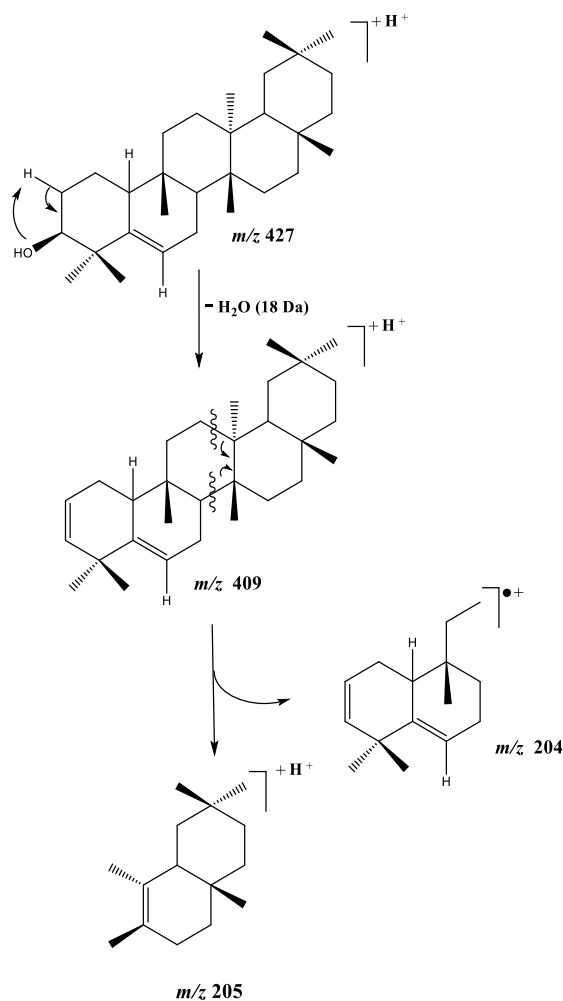


Figura 45. Proposta de fragmentação da molécula do glutinol (GF154). Vide espectro de massas na Figura 37.

A composição química de *T. glabrescens* ainda foi pouco explorada no tocante aos terpenoides e a ocorrência do glutinol na espécie é inédita. Na literatura estão relatados dados de RMN de 1H e de ^{13}C para o glutinol, mas não são apresentados os dados de experimentos bidimensionais para subsidiar algumas das atribuições. Os dados mais recentes relatados (FRAGA et al., 2003) baseiam-se somente na análise de espectros unidimensionais. Dessa forma, no presente trabalho apresentamos a atribuição inequívoca dos sinais de RMN de ^{13}C e de 1H do glutinol, com base na análise de espectros bidimensionais.

5.4.3.2 GF195

GF195, apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão de 134 a 139 °C. Esta faixa ampla sugeriu tratar-se de uma mistura, fato confirmado no espectro de RMN de ^1H que indicou trata-se de uma mistura de dois compostos.

Os cromatogramas obtidos para GF195 estão apresentados na Figura 46. O espectro no DAD registrado para GF195 apresentou máximo de absorção em λ 225,9 nm, atribuído a fase móvel utilizada (Figura 47). O espectro de massas no modo positivo de ionização não apresentou o pico do íon molecular, mas apresentou o pico base atribuído a $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ em m/z 409, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ e massa molecular 426,7 g/mol (Figura 47), condizente com triterpeno. A identificação dos constituintes de GF195 foi feita a partir da análise dos espectros de RMN.

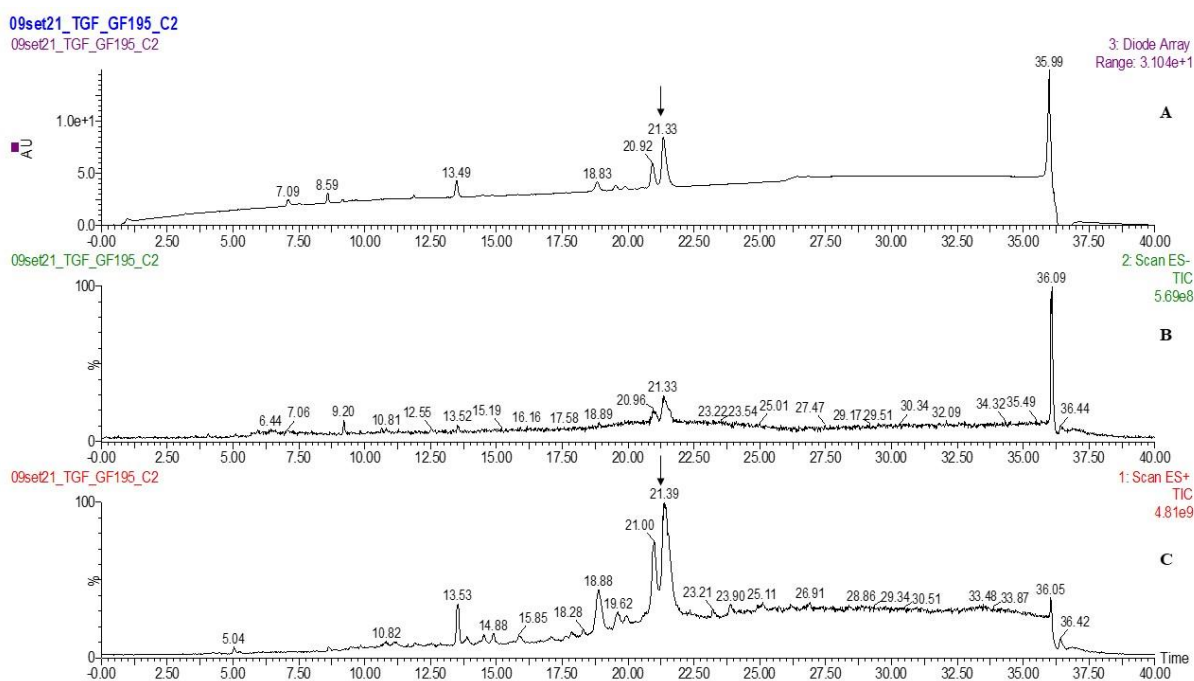


Figura 46. Cromatogramas obtidos para GF195 por UPLC-DAD-ESI-MS, com detecção no DAD (A), TIC ESI⁻ (B) e TIC ESI⁺ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

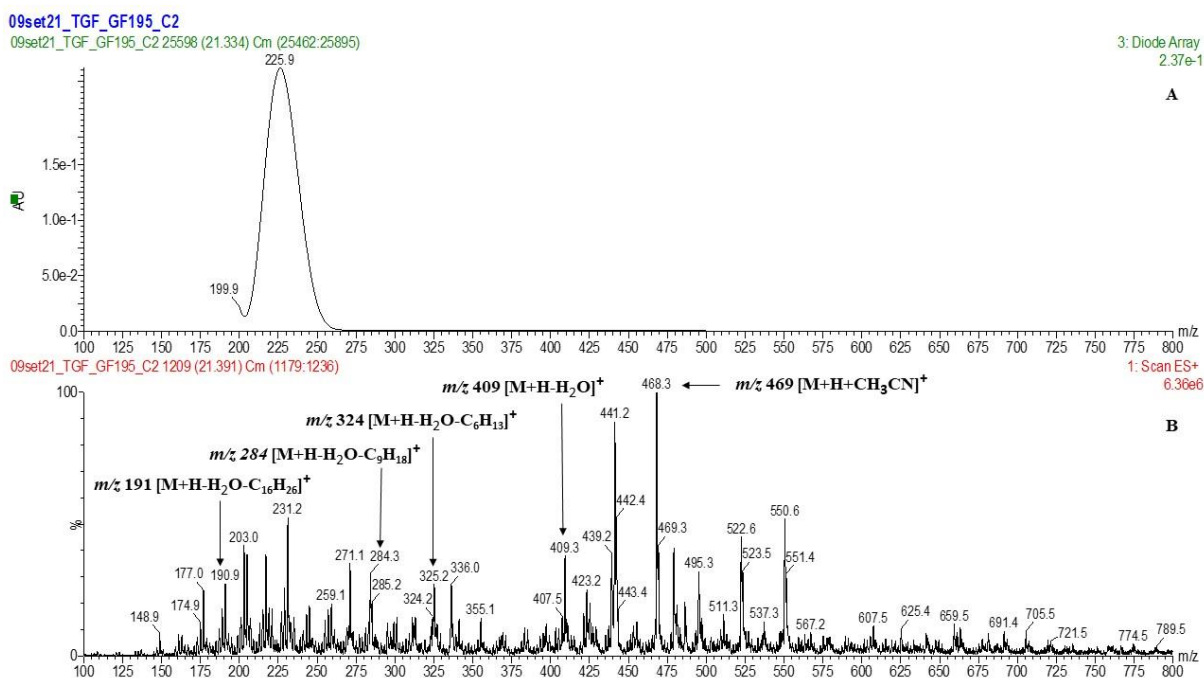


Figura 47. Espectro no UV (A) e de massas obtido para GF195 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, no modo de ionização positivo negativo ESI (B). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

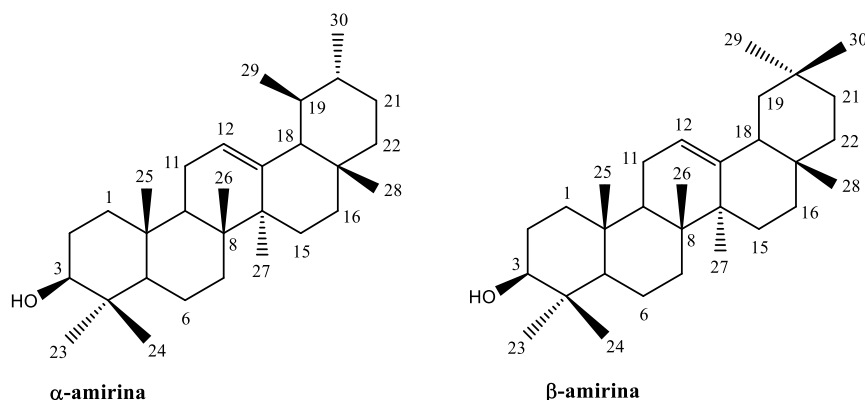
O espectro de RMN de ¹³C obtido para GF195 (Figuras 48 e 49) indicou 60 sinais de ressonância, caracterizando que a amostra se tratava de uma mistura de dois triterpenos. A multiplicidade dos sinais, apurada pelo subespectro DEPT-135 (Figura 50), indicou 8 carbonos metílicos, 9 carbonos metilênicos, 7 carbonos metínicos e 6 carbonos não hidrogenados para a molécula do urs-12-eno, enquanto para a molécula do oleano-12-eno foram identificados 8 carbonos metílicos, 10 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 7 carbonos não hidrogenados. Essas duas séries de triterpenos foram identificadas pelos deslocamentos químicos dos carbonos olefínicos, em urs-12-enos o carbono C-12 é desprotegido em cerca de 2 ppm e C-13 é blindado em 5 ppm, quando comparado aos carbonos olefínicos de oleano-12-enos (MAHATO et al., 1994). Em urs-12-enos, a diferença entre os dois valores de deslocamento químico dos carbonos C-12 e C-13, ocorre devido a presença do grupo metila na posição 19β (equatorial) que está próximo à ligação dupla. Já em oleano-12-eno, no anel E, o carbono C-18 mostra a maior diferença de valores entre as duas séries, cuja ressonância é deslocada para cerca de 11,5 ppm em olean-12-eno, devido a um efeito de blindagem do grupo metila na posição 20β (axial), que é gama-gauche (MAHATO et al., 1994). A análise do espectro de RMN de ¹H confirmou a presença de um hidrogênio olefínico em cada triterpeno (δ 5,12 e δ 5,18 ppm), bem como de uma hidroxila em cada um deles (δ 3,22 e δ 3,18 ppm).

Com base nos dados da literatura, concluiu-se que se tratava de uma mistura de triterpeno urs-12-eno e um oleano-12-eno, visto que a maioria dos deslocamentos químicos dos carbonos não apresentava muita variação (2-3 ppm) e somente três carbonos apresentaram uma variação maior (6-12 ppm).

Os sinais em δ 121,97 e δ 145,34 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-12 e C-13 do urs-12-eno, enquanto os sinais em δ 124,66 e δ 139,83 ppm foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-12 e C-13 do oleano-12-eno (Figuras 48 e 49). Os sinais do carbono carbinólico C-3 do urs-12-eno e do oleano-12-eno apareceram sobrepostos em δ 79,30 ppm.

Observaram-se diferenças consideráveis nos valores de deslocamento químico dos compostos das duas séries (ursano e oleanano) (Tabela 21), não só para os carbonos olefínicos C-12 e C-13, mas também para os sinais atribuídos aos carbonos C-18, C-19 e C-20, localizados no anel E dos triterpenos. Os sinais atribuídos a C-11 e C-27 na série dos ursanos aparecem com deslocamentos químicos mais afastados do TMS do que os correspondentes na série dos oleananos. Isto ocorre devido à mudança conformacional no anel E gerada pela proximidade espacial do grupo metila C-29 com os carbonos C-12, C-13 e C-27 nos derivados ursanos (SEO et al., 1975).

A análise do espectro de RMN de ^1H obtido para GF195 (Figura 51) possibilitou identificar alguns sinais característicos de triterpenos. Assim, os sinais em δ 5,12 (t, $J = 3,54$ Hz, 1H) e δ 5,18 (t, $J = 3,48$ Hz, 1H) foram atribuídos ao hidrogênio olefínico H-12 do derivado urs-12-eno e oleano-12-eno, respectivamente, enquanto os sinais em δ 3,22 (dd, $J = 11,34$ e 4,74 Hz, 1H) e δ 3,18 (dd, $J = 11,64$ e 4,86 Hz, 1H) foram atribuídos ao hidrogênio metínico H-3 ligado ao carbono carbinólico desses compostos. Para ambas as moléculas foram identificados oito simpletos atribuídos aos hidrogênios metílicos (Tabela 22). A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C com dados da literatura possibilitou caracterizar GF195 como sendo uma mistura de α e β -amirina.



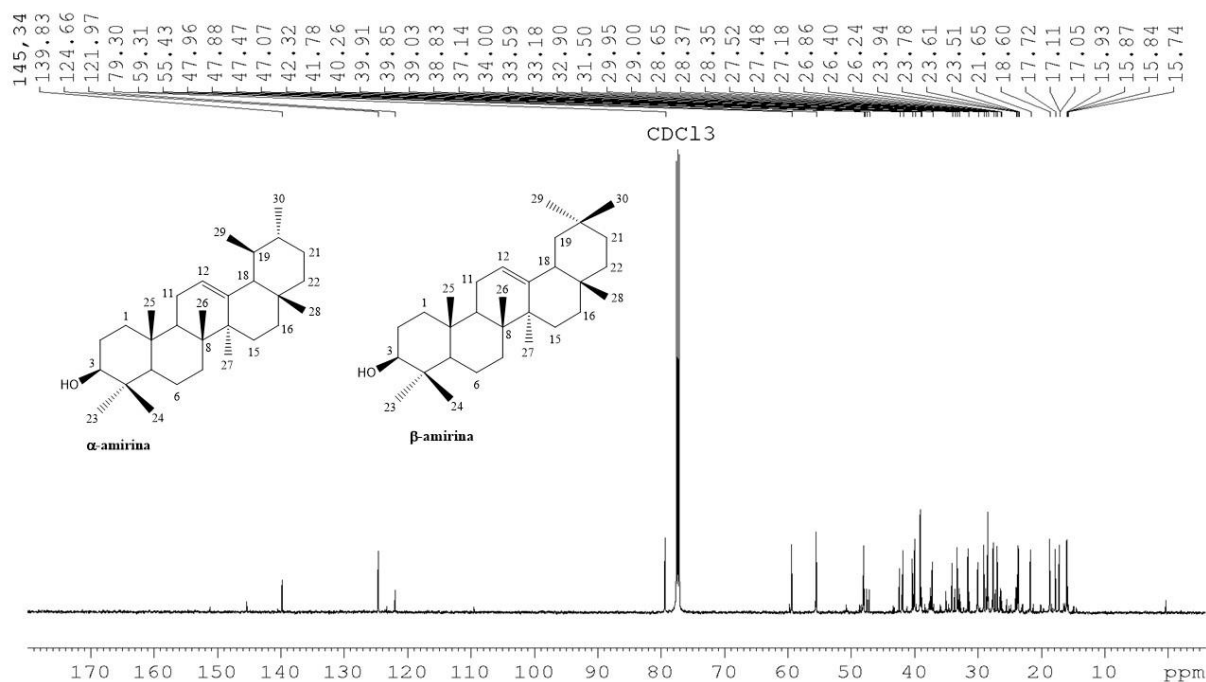


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para GF195 (CDCl_3 , 150 MHz).

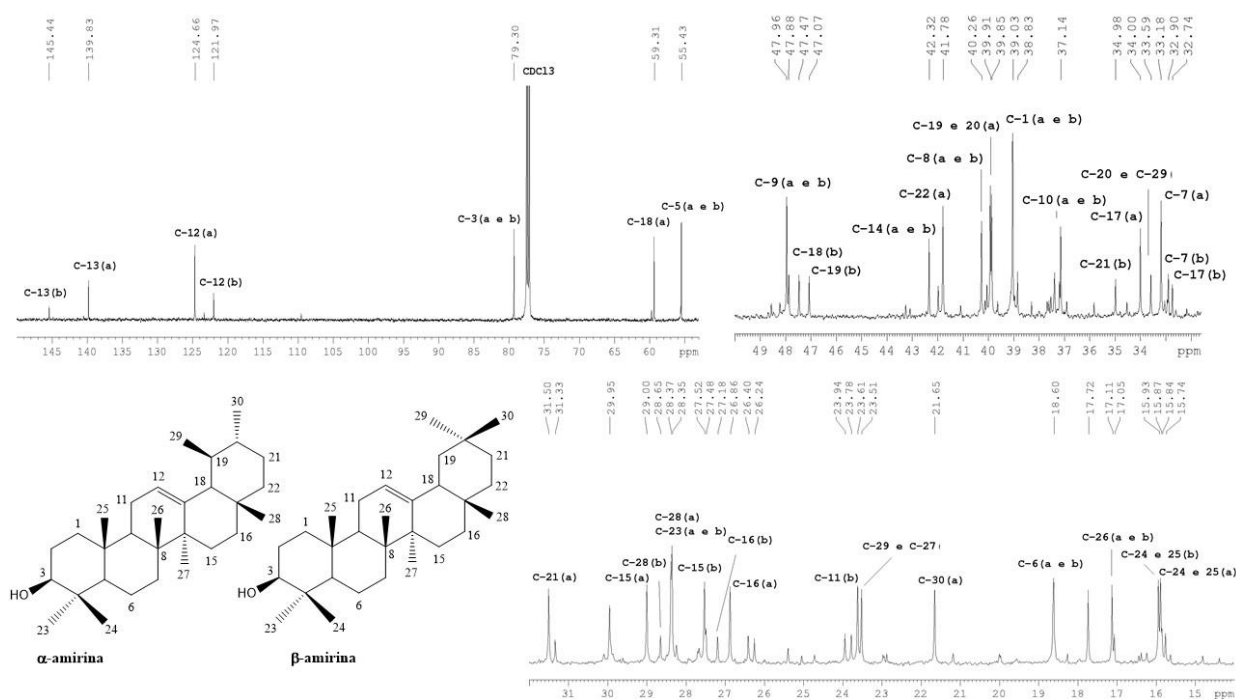


Figura 49. Expansões do espectro de RMN de ^{13}C obtido para GF195 (CDCl_3 , 150 MHz).

Legenda: (a) = α -amirina e (b) = β -amirina.

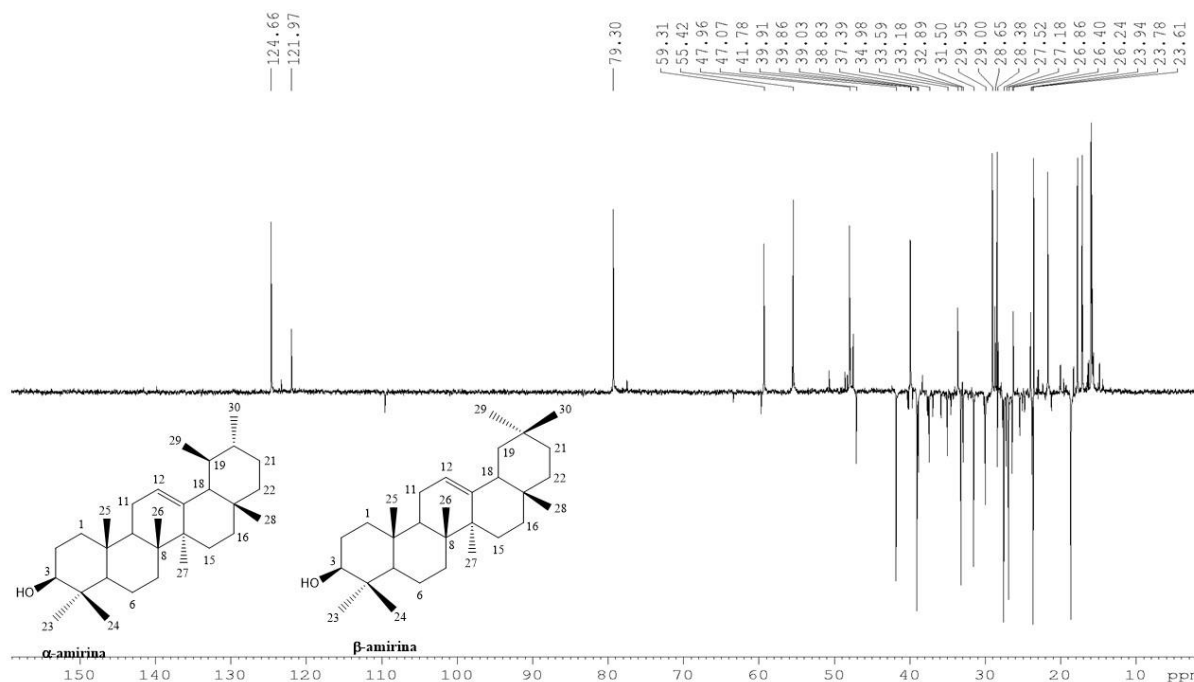


Figura 50. Subespectro DEPT-135 obtido para GF195 (CDCl_3 , 150 MHz). Legenda: (a) = α -amirina e (b) = β -amirina.

Tabela 21. Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C de GF195 (CDCl_3 , 150 MHz) e comparação com dados da literatura para α - e β -amirina (CDCl_3 , 50 MHz).

RMN de ^{13}C e DEPT-135					
Carbono	GF195 (α -amirina) δ (ppm)	GF195 (β -amirina) δ (ppm)	Multiplicidade	α -amirina (Seo et al., 1975) δ (ppm)	β -amirina (Seo et al., 1975) δ (ppm)
1	38,8	39,0	CH_2	38,7	38,5
2	27,1	27,5	CH_2	27,2	27,0
3	79,3	79,3	CH	78,8	78,9
4	37,1	37,1	C	38,7	38,7
5	55,4	55,4	CH	55,2	55,1
6	18,6	18,6	CH_2	18,3	18,3
7	33,1	32,9	CH_2	32,9	32,6
8	40,2	40,2	C	40,0	39,7
9	47,9	47,8	CH	47,7	47,6
10	37,1	37,1	C	36,9	37,0

Tabela 21. Continuação

11	18,6	23,6	CH ₂	17,4	23,4
12	124,6	121,9	CH	124,3	121,7
13	139,8	145,4	C	139,3	145,0
14	42,3	42,3	C	42,0	41,7
15	29,0	27,5	CH ₂	28,7	28,3
16	26,8	27,1	CH ₂	26,6	26,2
17	34,0	32,7	C	33,7	32,5
18	59,3	47,4	CH	58,9	47,2
19	39,8	47,0	CH / CH ₂	39,6	46,8
20	39,9	33,5	CH / C	39,6	31,1
21	31,5	34,9	CH ₂	31,2	34,8
22	41,7	37,3	CH ₂	41,5	37,2
23	28,3	28,3	CH ₃	28,1	28,1
24	15,7	15,8	CH ₃	15,6	15,5
25	15,8	15,9	CH ₃	15,6	15,5
26	17,0	17,1	CH ₃	16,8	16,8
27	23,5	26,2	CH ₃	23,3	26,0
28	28,3	28,6	CH ₃	28,1	27,3
29	23,5	33,5	CH ₃	23,3	33,2
30	21,6	23,9	CH ₃	21,3	23,6

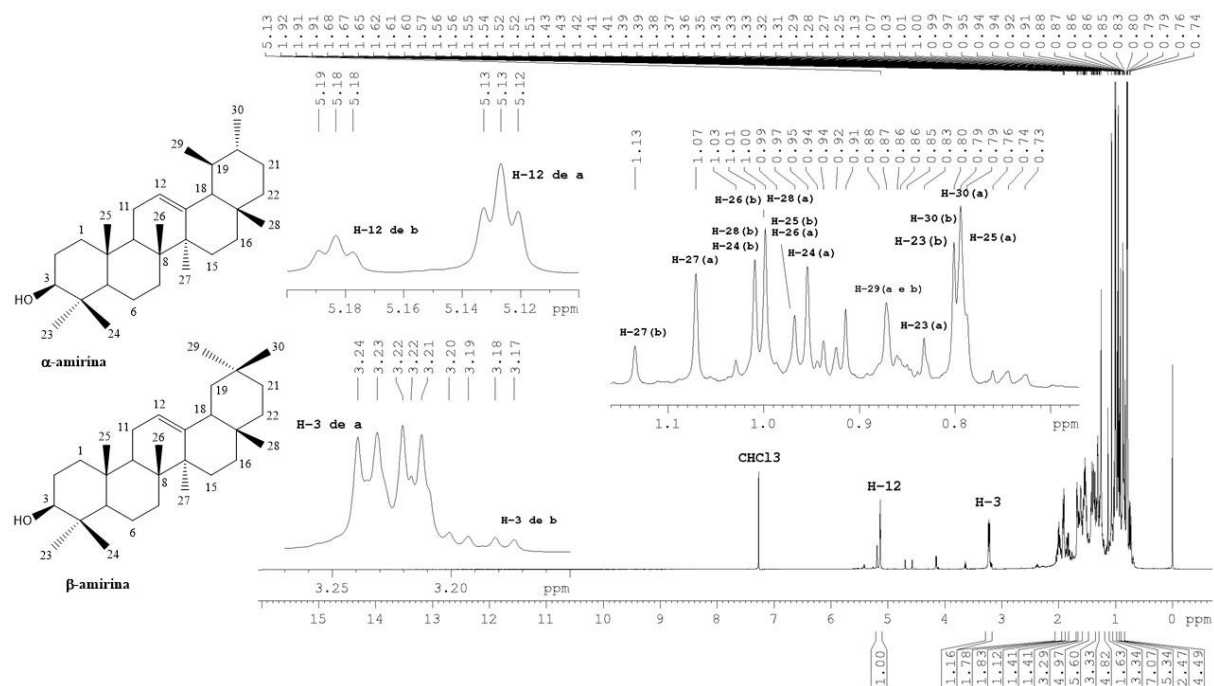


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H obtido para GF195 (CDCl_3 , 600 MHz). Legenda: (a) = α -amirina e (b) = β -amirina.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H obtidos para GF195 (CDCl_3 , 600 MHz) e dados da literatura relatados para α - e β -amirina (CDCl_3 , a 500 MHz e b 600 MHz).

H	GF195 (α -amirina) δ (ppm)	GF195 (β -amirina) δ (ppm)	α -amirina (a Dias et al., 2011) δ (ppm)	β -amirina (a Dias et al., 2011) δ (ppm)	α - / β -amirina (b Ebajo et al., 2015) δ (ppm)
3	3,22 (dd, $J=11,34$ e $4,74$)	3,18 (dd, $J=11,64$ e $4,86$)	3,16 (dd, $J=11,2$ e $5,1$)	3,15 (dd, $J=4,4;10,8$)	3,15
5	0,73 (d, $J=10,62$)	0,75 (m)	0,67 (d, $J=11,6$)	0,68 (d, $J=11,0$)	0,67
12	5,12 (t, $J= 3,54$)	5,18 (t, $J= 3,48$)	5,06 (t, $J= 3,2$)	5,12 (t, $J=3,2$)	5,12 / 5,16
15	1,95 (m)	1,89 (m)	1,94 (td, $J=13,5; 4,5$)	1,89 (td, $J=14,0; 4,0$)	-
16	1,76 (m)	1,74 (m)	1,76 (td, $J=13,5; 5,0$)	1,70 (td, $J=13,5; 4,3$)	-
19	1,91 (dd, $J=10,66$ e $3,15$)	1,98 (dd, $J=13,23$ e $4,54$)	1,93 (dd, $J=13,70$ e $4,0$)	1,93 (dd, $J=13,70$ e $4,0$)	-
22	1,83 (m)	1,85 (m)	1,85 (dt, $J=7,0$ e $3,0$)	1,80 (m)	-
23	0,83 (s)	0,80 (s)	0,93 (s)	0,77 (s)	0,95 / 0,77
24	0,93 (s)	1,00 (s)	0,74 (s)	0,90 (s)	0,76 / 0,90
25	0,78 (s)	0,95 (s)	0,73 (s)	0,73 (s)	0,75 / 0,74
26	0,96 (s)	0,99 (s)	0,89 (s)	0,93 (s)	0,89 / 0,93
27	1,07 (s)	1,13 (s)	1,01 (s)	1,19 (s)	1,01 / 1,16
28	0,99 (s)	1,00 (s)	0,94 (s)	1,07 (s)	0,95 / 1,07
29	0,86 (nd)	0,87 (nd)	0,85 (d, $J=6,0$)	0,87 (s)	0,85 (d, $J=6,0$) / 0,86
30	0,79 (nd)	0,80 (nd)	0,73 (d, $J=7,0$)	0,80 (s)	0,75 (d, $J=7,0$) / 0,79

Legenda: m = (multipleteo); nd (não definido).

Na Figura 52 está apresentada a proposta de fragmentação das moléculas de α - e β -amirina (GF195), com base no espectro de massas obtido (Figura 47).

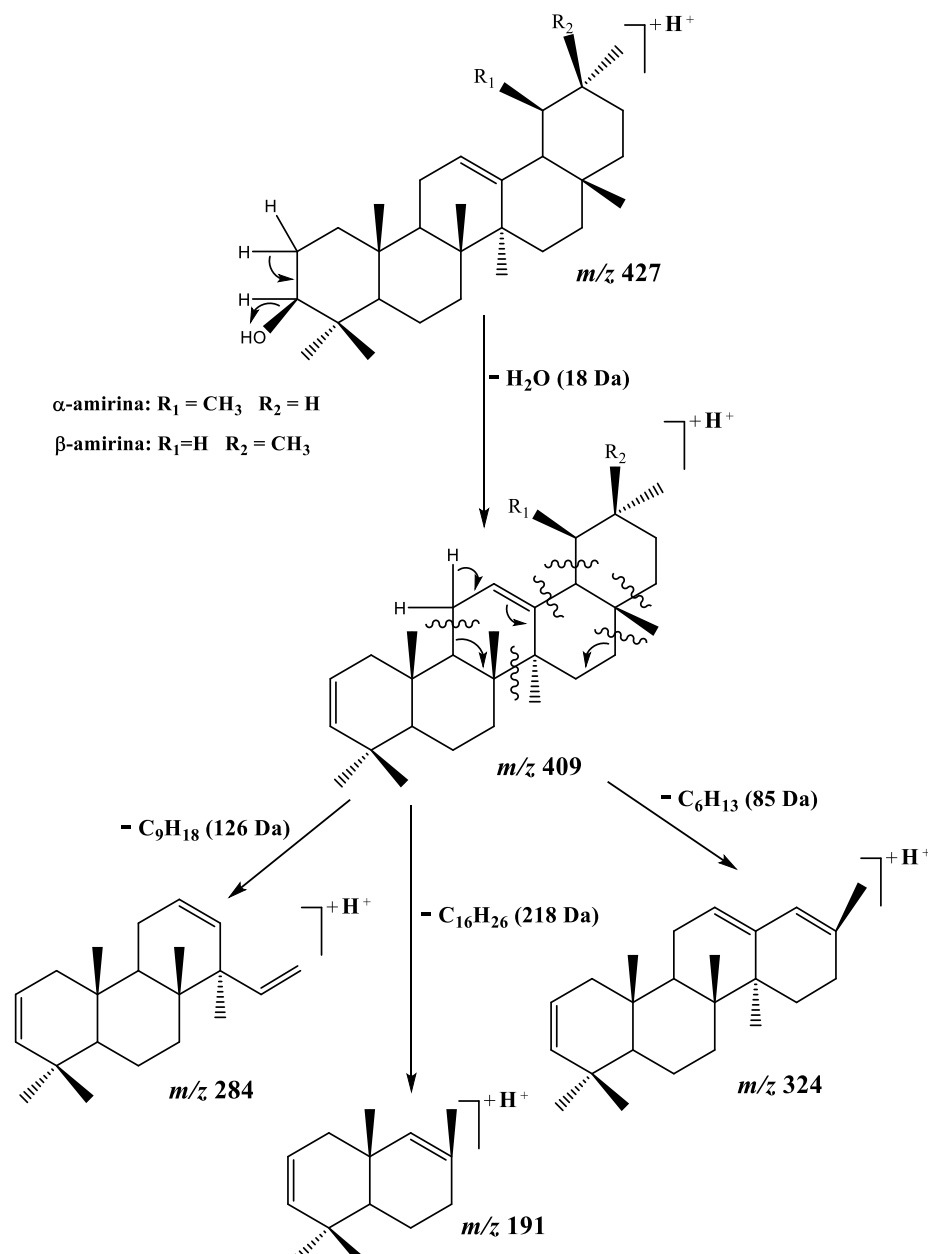


Figura 52. Proposta de fragmentação das moléculas de α - e β -amirina (GF195).

A ocorrência de α - e β -amirina foi previamente relatada em outras espécies do gênero *Terminalia*, tais como *T. brasiliensis* (ARAÚJO e CHAVES, 2005; ambas as substâncias foram identificadas), *T. arjuna* (CHAUHAN et al., 1997; identificação de β -amirina), *T. avicennioides* (MANN et al., 2012; identificação de α - amirina) e *T. glaucescens* (ATTA-UR-RAHMAN et

al., 2002; identificação de β -amirina). Entretanto, a ocorrência de α - e β -amirina aqui relatada para *T. glabrescens* é inédita.

5.4.3.3 GF231

GF231 apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão 131 a 136 °C. Os cromatogramas obtidos para GF231 estão representados na Figura 53. O espectro no DAD registrado para GF231 apresentou máximo de absorção em λ 226,9 nm, atribuído a fase móvel utilizada (Figura 54). O espectro de massas no modo positivo de ionização não apresentou o pico do íon molecular, mas apresentou o pico base atribuído a $[M+H-H_2O]^+$ em m/z 397, compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$ e massa molecular 414,7 g/mol (Figura 54). Os dados obtidos são compatíveis com um esteroide, cuja identificação foi feita a partir da análise dos espectros de RMN.

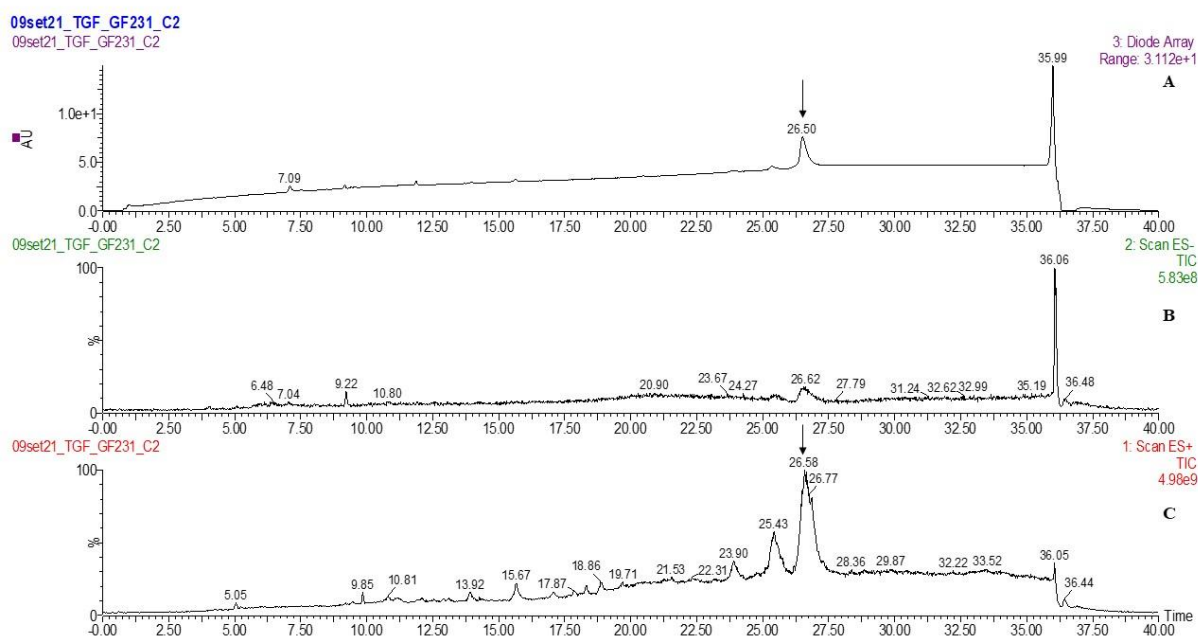


Figura 53. Cromatogramas obtidos para GF231 por UPLC-DAD-ESI-MS, com detecção no DAD (A), TIC ESI⁻ (B) e TIC ESI⁺ (C). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

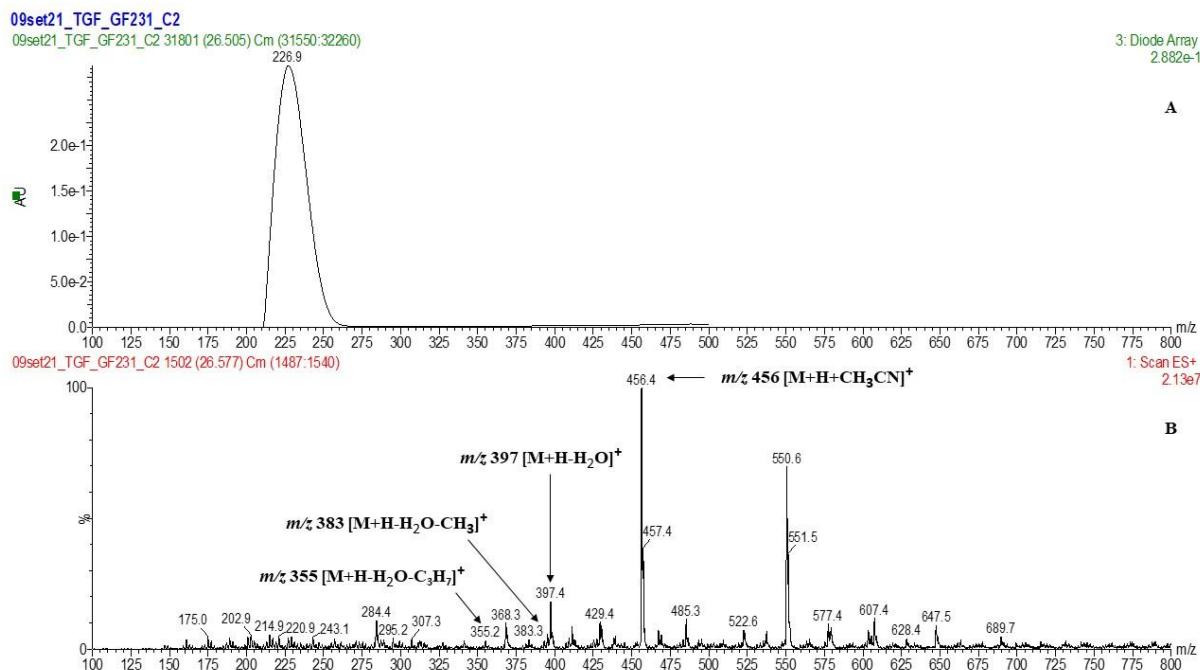


Figura 54. Espectro no UV (A) e de massas obtido para GF231 por UPLC-DAD-ESI-MS/MS, no modo de ionização positivo ESI⁺ (B). Condições cromatográficas e espectroscópicas: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

A análise do espectro de RMN de ¹³C obtido para GF231 (Figura 55) indicou 29 sinais de ressonância, compatível com um esteroide. O subespectro DEPT-135 (Figura 56) possibilitou identificar seis carbonos metálicos, dez carbonos metilênicos e oito carbonos metínicos. Dessa forma, GF231 apresenta três carbonos não hidrogenados, referentes aos sinais de ressonância δ 140,78, δ 36,53 e δ 42,33 ppm, os quais foram atribuídos aos carbonos C-5, C-10 e C-13, respectivamente.

Os sinais em δ 121,73 e δ 140,78 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-6 e C-5, enquanto o sinal em δ 71,83 foi atribuído ao carbono carbinólico C-3. A comparação dos valores de deslocamento químico obtidos para GF231 com aqueles relatados na literatura para outros fitosteróis possibilitou identificá-lo como sendo β -sitosterol (Tabela 23).

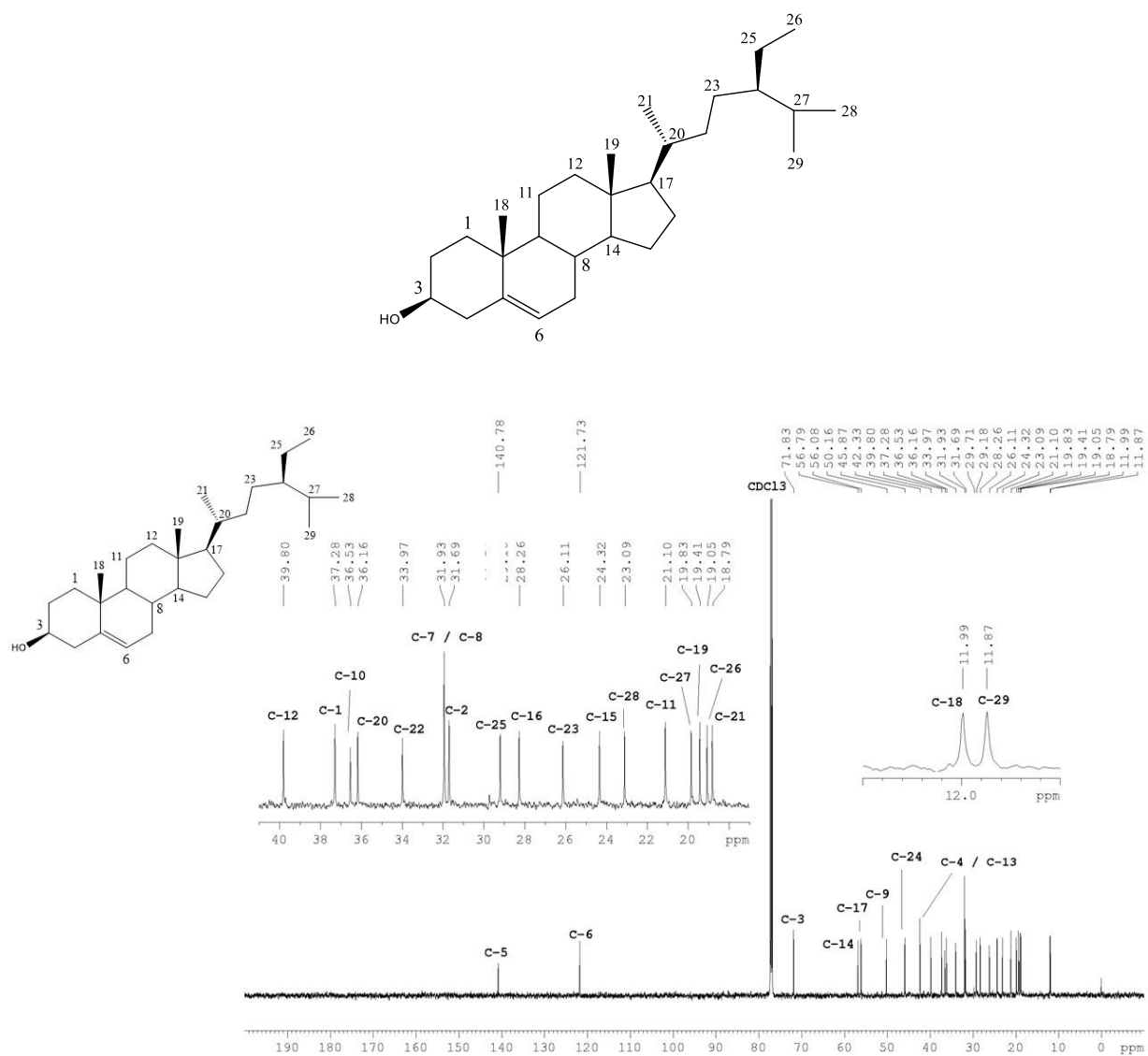


Figura 55. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para GF231 (CDCl_3 , 150 MHz).

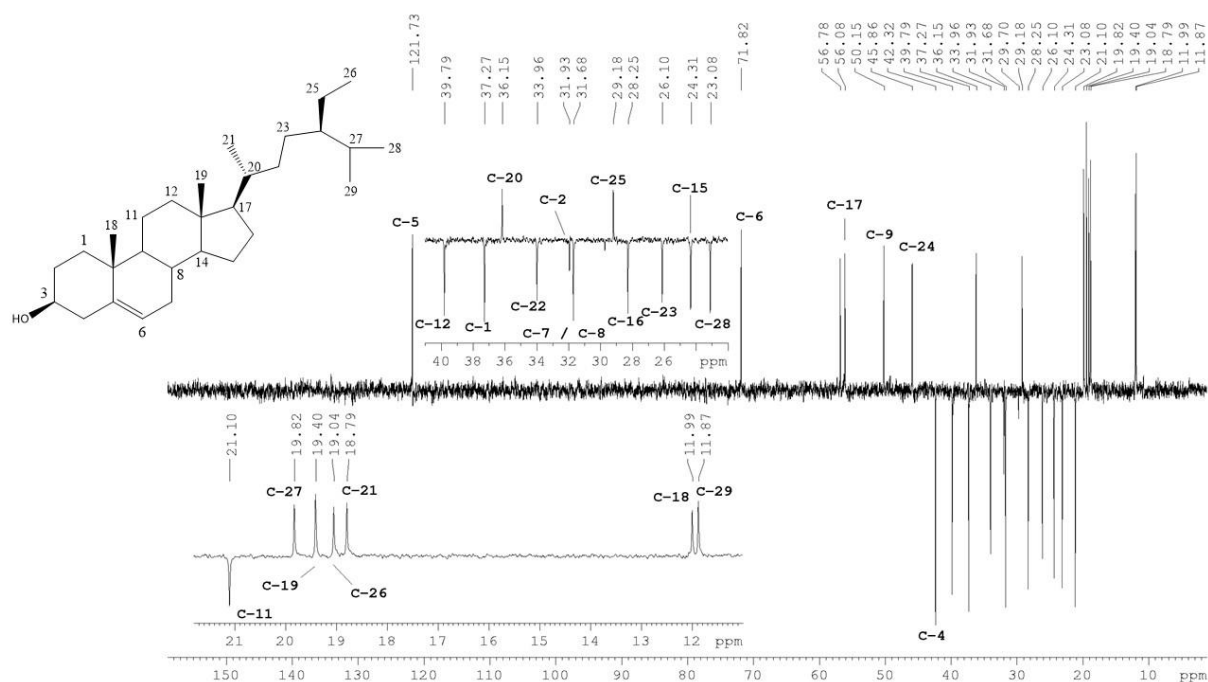


Figura 56. Subespectro DEPT-135 obtido para GF231 (CDCl_3 , 150 MHz).

Tabela 23. Comparação entre valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C obtidos para GF231 (CDCl_3 , 150 MHz) com dados da literatura relatados para o β -sitosterol (CDCl_3 , $^{a}100$ MHz e $^{b}90,56$ MHz).

RMN de ^{13}C e DEPT-135				
Carbono	GF231 δ (ppm)	Multiplicidade	β -sitosterol (a Cayme e Ragasa, 2004) δ (ppm)	β -sitosterol (b Kovganko et al., 1990) δ (ppm)
1	37,2	CH_2	37,2	37,3
2	31,6	CH_2	31,6	31,6
3	71,8	CH	71,8	71,8
4	42,3	CH_2	42,2	42,3
5	140,7	C	140,7	140,8
6	121,7	CH	121,7	121,7
7	31,9	CH_2	31,9	32,1
8	31,9	CH	31,9	32,1
9	50,1	CH	50,1	50,2
10	36,5	C	36,5	36,5
11	21,1	CH_2	21,0	21,1

Tabela 23. Continuação

12	39,8	CH ₂	39,8	39,8
13	42,3	C	42,1	42,3
14	56,7	CH	56,7	56,8
15	24,3	CH ₂	24,3	24,3
16	28,2	CH ₂	28,2	28,3
17	56,0	CH	56,0	56,1
18	11,9	CH ₃	11,9	12,0
19	19,4	CH ₃	19,4	19,1
20	36,1	CH	36,1	36,2
21	18,7	CH ₃	18,8	18,8
22	33,9	CH ₂	33,9	34,0
23	26,1	CH ₂	26,0	26,2
24	45,8	CH	45,8	45,2
25	23,0	CH ₂	23,0	23,1
26	11,8	CH ₃	11,8	11,9
27	29,1	CH	29,1	29,2
28	19,0	CH ₃	19,0	18,9
29	19,8	CH ₃	19,8	19,1

A análise do espectro de RMN de ¹H de GF231 (Figura 57) possibilitou identificar alguns sinais característicos do β-sitosterol. Assim, o sinal em δ 5,35 (m, 1H) foi atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e o sinal em δ 3,52 (m, 1H) foi atribuído ao hidrogênio H-3 ligado ao carbono carbinólico. Os hidrogênios dos sete grupos metila presentes na molécula foram atribuídos aos sinais em δ 0,68 (s, 3H, H-19), 0,81 (d, *J* = 6,84 Hz, 3H, H-28), δ 0,84 (d, *J* = 7,50 Hz, 3H, H-29), δ 0,86 (m, 3H, H-26), δ 0,92 (d, *J* = 6,48 Hz, 3H, H-21), δ 1,01 (s, 3H, H-18). Por sua vez, os sinais em δ 1,46 (H-8), δ 0,94 (H-9), δ 0,99 (H-14), δ 1,10 (H-17), δ 1,36 (H-20), δ 0,93 (H-24) e δ 1,66 (H-27) foram atribuídos aos hidrogênios metínicos. Os valores de deslocamentos químicos atribuídas aos hidrogênios de GF231 (β-sitosterol), bem como as constantes de acoplamento escalar e multiplicidades dos sinais estão apresentados na Tabela

24.

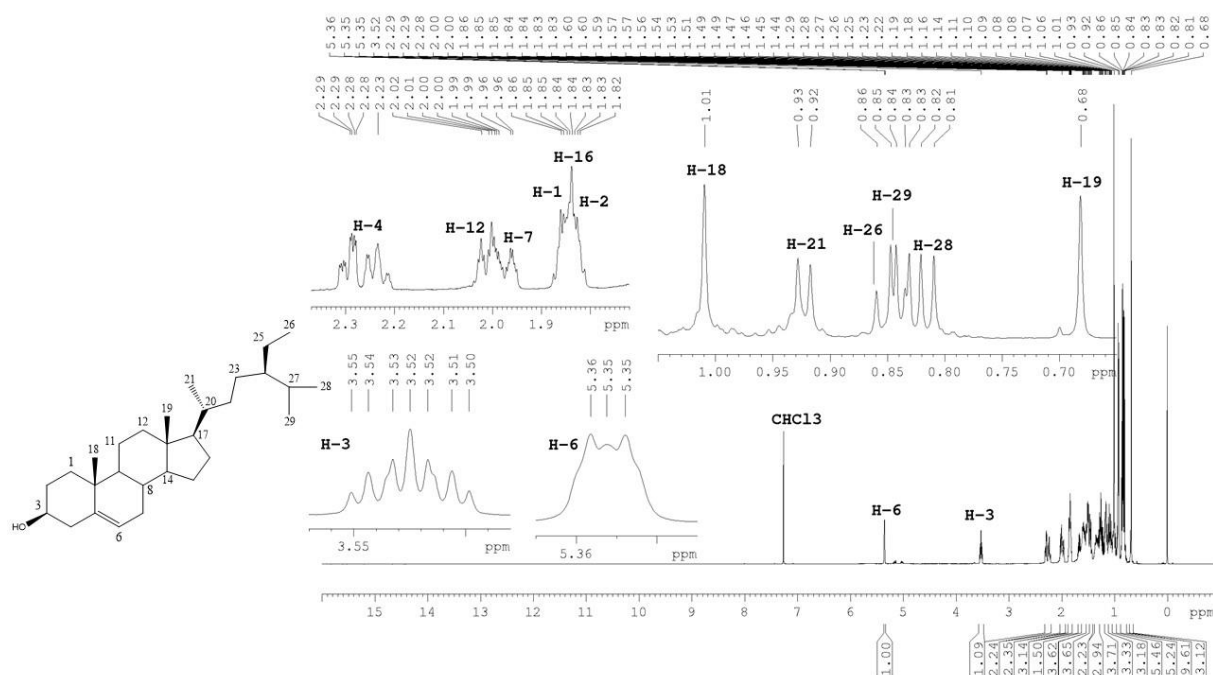


Figura 57. Espectro de RMN de ^1H obtido para GF231 e expansões (CDCl_3 , 600 MHz).

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) comparados com dados da literatura (CDCl_3 , 300 MHz).

H	RMN de ^1H	
	GF231 δ (ppm)	β -sitosterol (Cayme e Ragasa, 2004) δ (ppm)
1	1,08a / 1,85b	1,08a / 1,83b
2	1,49a / 1,83b	1,49a / 1,82b
3	3,52 (m)	3,53
4	2,23a / 2,28b	2,24a / 2,28b
6	5,35 (m)	5,35 (d, $J = 4,7$ Hz)
7	1,51a / 1,98b	1,56a / 1,98b
8	1,46	1,46
9	0,94	0,94
11	1,45a / 1,47b	1,45a / 1,48b
12	1,16a / 2,00b	1,15a / 1,97b
14	0,99	1,03

Tabela 24. Continuação

15	1,07a / 1,58b	1,05a / 1,55b
16	1,27a / 1,84b	1,24
17	1,10	1,13
18	1,01 (s)	1,01
19	0,68 (s)	0,68
20	1,36	1,36
21	0,92 (d, $J = 6,48$ Hz)	0,94 (d)
22	1,32	1,32
23	1,16	1,15
24	0,93	0,93
25	1,23	1,22
26	0,86 (m)	0,85 (t)
27	1,66	1,65
28	0,81 (d, $J = 6,84$ Hz)	0,82 (d, $J = 6,3$ Hz)
29	0,84 (d, $J = 7,50$ Hz)	0,83 (d, $J = 6,1$ Hz)

Legenda: a = alfa; b = beta; m = (multipeto).

Os dados de fragmentação obtidos no espectro de massas de GF231 (Figura 54) corroboram tratar-se do β -sitosterol e a proposta de fragmentação está representada na figura 58.

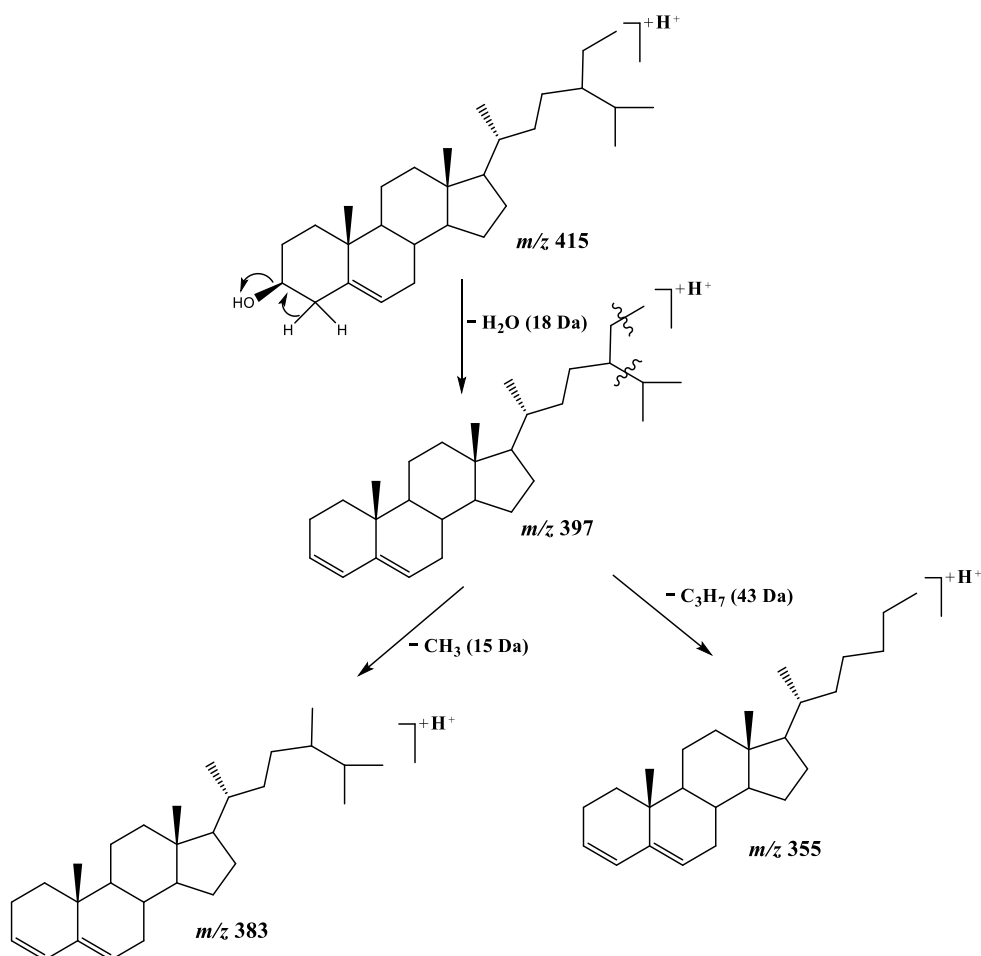


Figura 58. Proposta de fragmentação da molécula de β-sitosterol.

Estudo fitoquímico anterior do extrato etanólico de cascas do tronco de *T. glabrescens* resultou no isolamento do β-sitosterol (GARCEZ et al., 2003). Portanto, o β-sitosterol é um constituinte de *T. glabrescens*, visto que está presente nas folhas e cascas do tronco da planta.

5.4.4 Identificação do sólido isolado de *M. ilicifolia*

O fracionamento do extrato diclorometânico de folhas de *M. ilicifolia* por cromatografia em coluna de sílica gel *flash* resultou no isolamento de um sólido denominado de SOL1 (item 4.11.4). Este apresentou-se como um sólido branco, com faixa de fusão 262 a 265 °C. A análise do SOL1 por CCD de sílica gel 60 apresentou mancha única, de coloração rosa após revelação com anisaldeído/ácido sulfúrico, sugerindo tratar-se de um terpeno (GERLACH et al, 2018).

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 59) de SOL1 indicou a presença de 30 sinais, sugerindo tratar-se de um triterpeno. A partir do subespectro DEPT-135 (Figura 60) definiu-se a multiplicidade dos sinais como sendo 8 carbonos metílicos, 11 carbonos metilênicos, 5 carbonos metínicos e 6 carbonos não hidrogenados. A análise do espectro de RMN de ¹³C

(Figura 59) indicou que o composto apresenta um carbono carbinólico (C-3) atribuído ao sinal em δ 72,7 ppm e não apresenta carbonos olefínicos. A atribuição completa dos sinais de RMN de ^{13}C está descrita na Tabela 25.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 61) possibilitou atribuir o sinal em δ 3,73 (m, 1H) ao hidrogênio metínico H-3 ligado ao carbono carbinólico C-3. A análise do espectro confirmou a ausência de hidrogênios olefínicos. Os sete simpletos em δ 0,96 (H-24); δ 0,85 (H-25); δ 1,00 (H-26); δ 0,99 (H-27); δ 1,17 (H-28); δ 1,00 (H-29) e δ 0,95 (H-30) e um duplete sobreposto em δ 0,94 ($J = 7,49$ Hz, H-23) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos. Já os sinais em δ 1,25 (H-4), δ 1,27 (H-8), δ 0,90 (H-10) e δ 1,55 (H-18) foram atribuídos aos hidrogênios metínicos (Tabela 26). A comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos com dados da literatura possibilitaram identificar SOL1 como sendo o friedelan-3 β -ol.

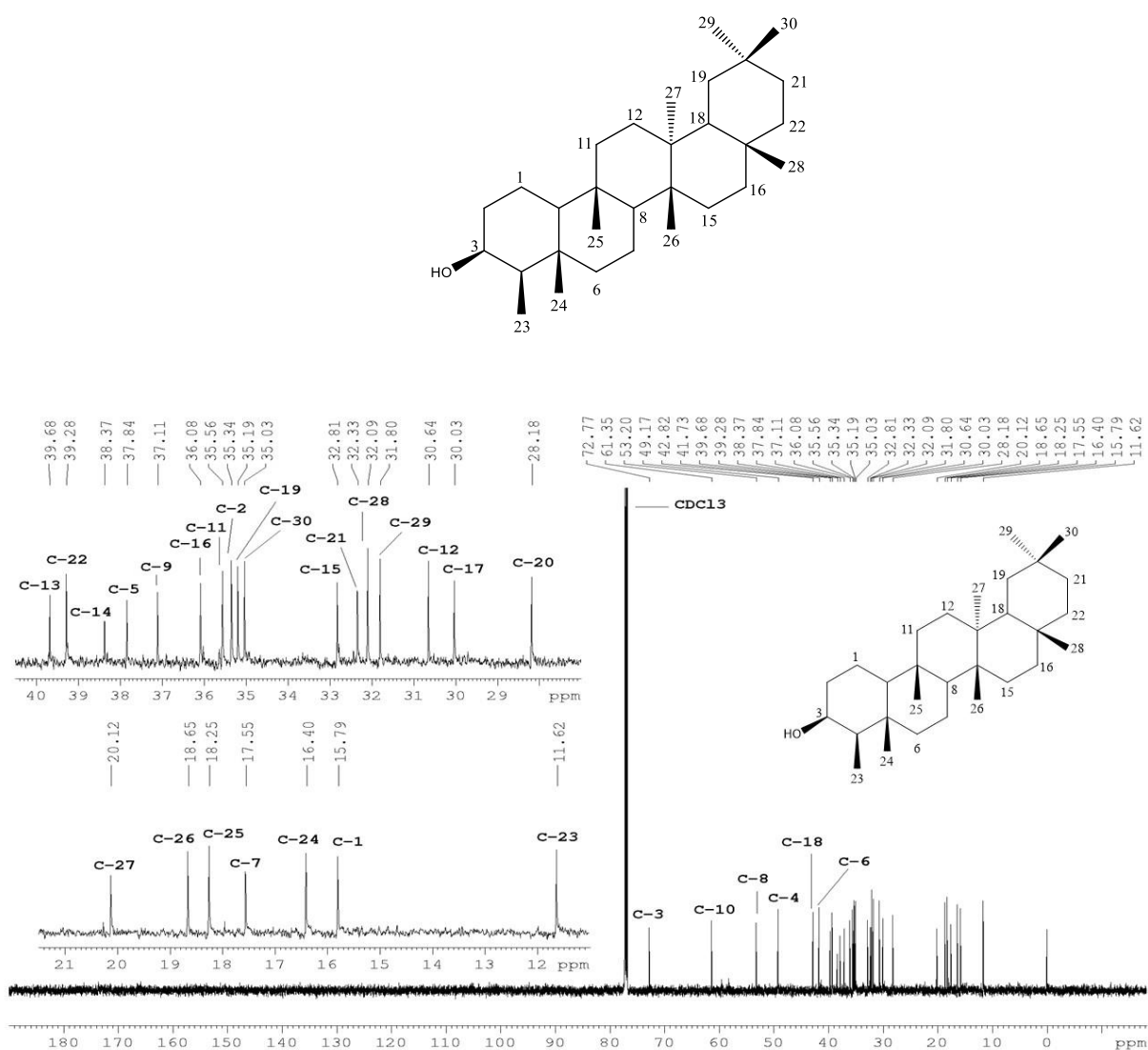


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C obtido para SOL1 (CDCl_3 , 150 MHz).

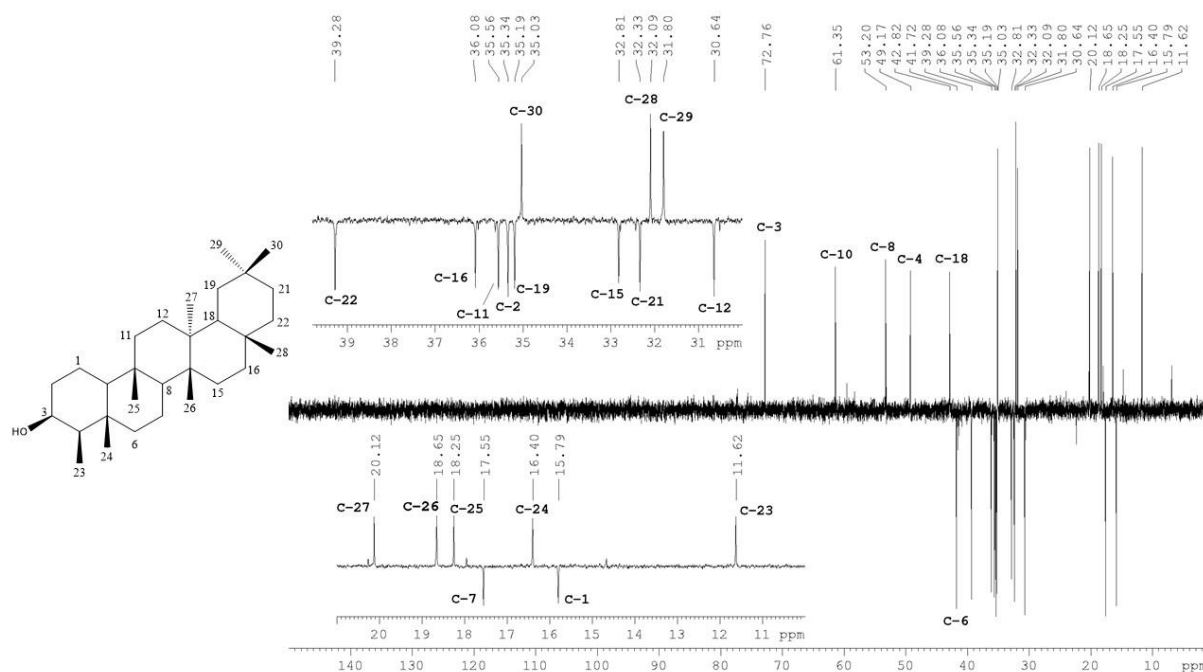


Figura 60. Subspectro de DEPT-135 obtido para SOL1 (CDCl₃, 150 MHz).

Tabela 25. Atribuição dos sinais de RMN de ¹³C obtidos para SOL1 (CDCl₃, 150 MHz) e comparação com dados da literatura relatados para o friedelan-3β-ol (CDCl₃, ^a50 MHz e ^b75 MHz).

RMN de ¹³ C e DEPT-135				
Carbono	SOL1 δ (ppm)	Multiplicidade	Friedelan-3β-ol (^a Guimarães e Siani, 2007) δ (ppm)	Friedelan-3β-ol (^b Kiem et al., 2004) δ (ppm)
1	15,7	CH ₂	15,8	16,2
2	35,3	CH ₂	35,3	35,7
3	72,7	CH	72,7	73,1
4	49,1	CH	49,2	49,6
5	37,8	C	37,9	37,5
6	41,7	CH ₂	41,8	42,1
7	17,5	CH ₂	17,5	17,9
8	53,1	CH	53,2	53,6
9	37,1	C	37,1	38,2
10	61,3	CH	61,5	61,8

Tabela 25. Continuação

11	35,5	CH ₂	35,6	35,6
12	30,6	CH ₂	30,6 ou 32,4 ou 32,9	30,6
13	39,6	C	39,7	38,7
14	38,3	C	38,4	40,0
15	32,8	CH ₂	30,6 ou 32,4 ou 32,9	32,8
16	36,0	CH ₂	36,1	36,5
17	30,0	C	30,0	30,0
18	42,8	CH	42,9	43,2
19	35,1	CH ₂	35,4	35,9
20	28,1	C	28,1	28,7
21	32,3	CH ₂	30,6 ou 32,4 ou 32,9	32,4
22	39,2	CH ₂	39,3	39,7
23	11,6	CH ₃	11,5	12,0
24	16,3	CH ₃	16,4	16,8
25	18,2	CH ₃	18,2	18,6
26	18,6	CH ₃	18,6	19,0
27	20,1	CH ₃	20,1	20,5
28	32,0	CH ₃	32,1	32,5
29	31,7	CH ₃	31,8	32,2
30	35,0	CH ₃	35,0	35,4

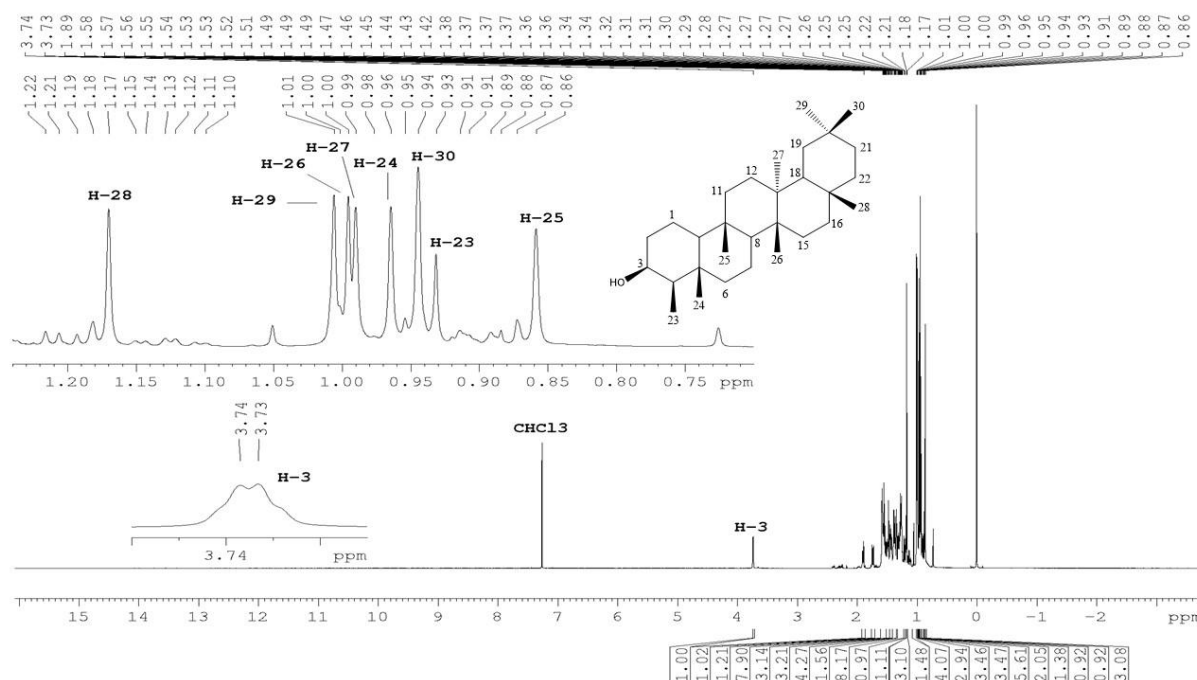


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H obtido para SOL1 (CDCl_3 , 600 MHz).

Tabela 26. Atribuição dos sinais de RMN de ^1H obtidos para SOL1 (CDCl_3 , 600 MHz) e comparação com dados da literatura relatados para o friedelan-3 β -ol (CDCl_3 , ^a500 MHz e ^b300 MHz).

H	SOL1 δ (ppm)	Friedelan-3 β -ol (^a Almeida et al., 2011) δ (ppm)	Friedelan-3 β -ol (^b Kiem et al., 2004) δ (ppm)
1	1,44a / 1,55b	1,43 (m)	-
2	1,21a / 1,36b	1,90 (dt, $J = 10,0$ e $2,3$ Hz) / 1,56 (m)	-
3	3,73 (m)	3, 73 (m)	3,73 (d)
4	1,25	0,94 (s)	-
6	1,74a (dt, $J = 12,64$ e $3,12$ Hz) / 1,40b (m)	1,74 (dt, $J = 10,0$ e $3,0$) / 1,45 (m)	-
7	1,39	-	-
8	1,27	-	-
10	0,90	-	-
11	1,13a / 1,43b	-	-
12	1,32	-	-

Tabela 26. Continuação

15	1,27a / 1,47b	-	-
16	1,35a / 1,54b	-	-
18	1,55	1,57 (m)	-
19	1,56a (m) / 1,90b (dt, $J = 10,29$ e $3,19$ Hz)	-	-
21	1,28a / 1,49b	-	-
22	0,93a / 1,49b	0,91 (m)	-
23	0,93 (d, $J = 7,49$ Hz)	0,93 (d, $J = 7,3$ Hz)	0,91 (d, $J = 7,0$ Hz)
24	0,96 (s)	0,97 (s)	0,93 (s)
25	0,85 (s)	0,86 (s)	0,83 (s)
26	0,99 (s)	0,99 (s)	0,98 (s)
27	0,98 (s)	1,01 (s)	0,95 (s)
28	1,16 (s)	1,17 (s)	0,97 (s)
29	0,94 (s)	0,95 (s)	0,92 (s)
30	1,00 (s)	1,00 (s)	1,14 (s)

Legenda: m = (multiplete).

A ocorrência do friedelan-3 β -ol em folhas de *M. ilicifolia* foi previamente relatada por Queiroga e colaboradores (2000).

5.5 Avaliação da atividade anti-ZIKV de frações e substâncias isoladas

5.5.1 Avaliação da viabilidade celular

A partir dos resultados dos ensaios de atividade anti-ZIKV, os extratos de *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa* foram fracionados e as frações obtidas tiveram a viabilidade celular avaliada nas linhagens Vero CCL-81 e SH-SY5Y. As frações de *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa* (diclorometânica, em acetato de etila e metanólica) foram avaliadas nas concentrações de 3, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$ pelos métodos do MTT e LDH.

Em células Vero CCL-81, as frações DCM e MEOH de *T. phaeocarpa* e a fração EtOAc etila de *T. glabrescens* apresentaram viabilidade celular em torno de 80%, valor considerado não citotóxico no presente estudo (Figura 62). Na linhagem SH-SY5Y, somente a fração DCM de *T. phaeocarpa* apresentou a viabilidade celular inferior a 100% (em torno de 85%), valor

satisfatório para realizar a avaliação da atividade antiviral (Figura 63). Portanto, as frações *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa* não foram citotóxicas quando comparados com o grupo controle de células.

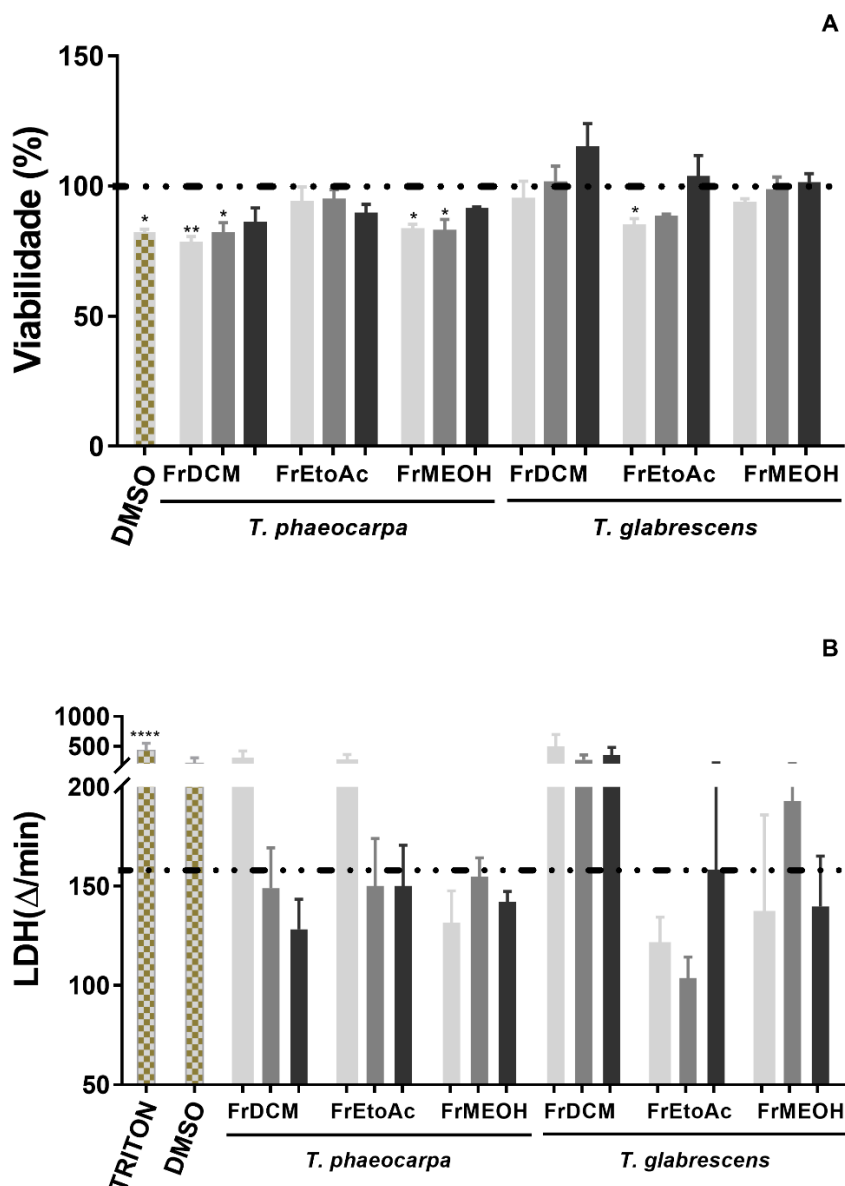


Figura 62. Viabilidade celular das frações de *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* em células Vero CCL-81 empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).

As frações foram testadas a 3 μg/mL (barras cinza-claras), 10 μg/mL (barras cinza-médias) e 30 μg/mL (barras pretas). As barras representam valores médios ± SEM, onde * p<0,05, *** p<0,001 e **** p<0,0001 versus grupo controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem a fração.

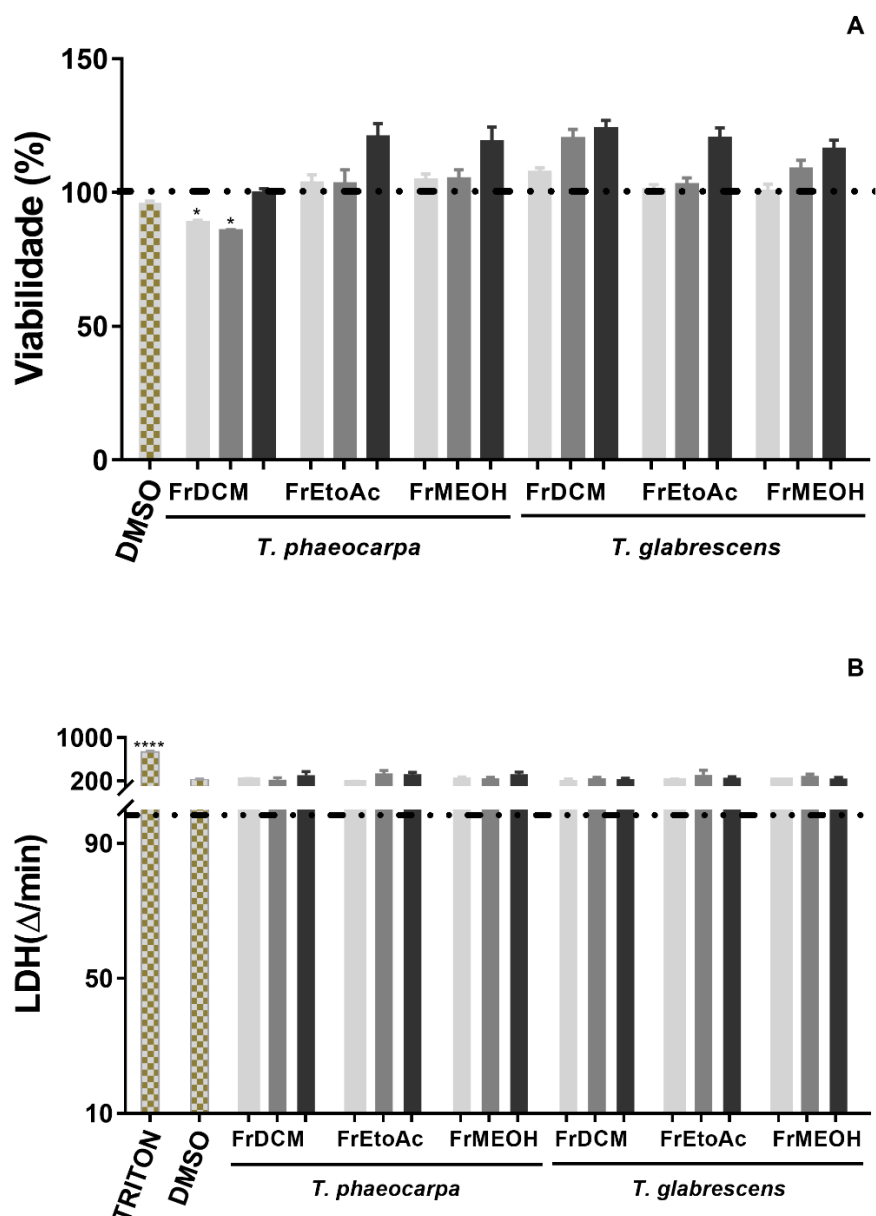


Figura 63. Viabilidade celular das frações de *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* em células SH-SY5Y, empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).

As frações foram testados a 3 μg/mL (barras cinza-claras), 10 μg/mL (barras cinza-médias) e 30 μg/mL (barras pretas). As barras representam valores médios ± SEM, onde * p<0,05, *** p<0,001 e **** p<0,0001 versus grupo controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem a fração.

5.5.2 Atividade anti-ZIKV das frações de *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa*

As frações de *T. glabrescens* e *T. phaeocarpa* (diclorometânica, acetato de etila e metanólica) foram avaliadas em células Vero CCL-81 e SH-SY5Y infectadas com ZIKV. Em células Vero CCL-81, as frações FrDCM (1,4; 4,1 e 5,1 log de redução da carga viral) e FrEtoAc (0,9; 0,9 e 1,9 log de redução) de *T. phaeocarpa* reduziram significativamente a carga viral de maneira dependente da concentração (Figura 64C). Resultados semelhantes foram obtidos para as frações FrDCM (0,9; 4,7 e 5,1 log de redução) e FrEtoAc (1,1; 3,7 e 5,1 log de redução) de

T. glabrescens (Figura 64C). A viabilidade celular das células infectadas e tratadas não foi alterada em comparação ao grupo controle (ZIKV+DMSO) (Figura 64A). Portanto, a redução da carga viral indica um efeito antiviral das frações testadas (Figura 64C).

A caracterização da composição química do extrato etanólico e das frações de *T. phaeocarpa* resultou na identificação de diversos polifenóis (GOMES et al., 2021), também identificados no presente trabalho no extrato etanólico e frações de *T. glabrescens* (item 5.4.1.1). Já a avaliação do extrato diclorometânico de *M. ilicifolia* resultou na identificação de triterpenos (item 5.4.1.2). Por sua vez, a análise de constituintes lipofílicos presentes nas frações de *T. glabrescens* e *M. ilicifolia* resultou na identificação de ésteres, 1-dodecanol, friedelan-3-ona e hidrocarbonetos. Com isso, é possível inferir que estes constituintes sejam os bioativos de *T. glabrescens* e *M. ilicifolia*, com base em sua ocorrência na espécie e na atividade antiviral apresentada.

Alguns relatos sobre atividade antiviral foram descritos na sequência para os compostos identificados em *M. ilicifolia* e *T. glabrescens* e outros relatos já foram descritos nos itens 5.3.2 e 5.3.5. Lupeol foi descrito como ativo contra o vírus do dengue sorotipo 2 em células Vero (GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017). Por sua vez, o ácido betulínico foi ativo contra o ZIKV em células progenitoras neurais humanas (CAVALCANTE et al., 2020) e contra o vírus do dengue sorotipo 2 em linhagens de células Huh7, BHK-21, HepG2, HEK293T e células Vero (LOE et al., 2020). A β -amirina foi descrita como ativa contra os vírus influenza A e herpes simples (RAO e SINSHEIMER, 1974), e o ácido ursólico exerceu um potente efeito antiviral contra o vírus herpes simples, o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus da hepatite C humana (BAG et al., 2012; HATTORI et al., 2013). Além disso, o ácido elágico mostrou atividade contra o ZIKV em células Vero (ACQUADRO et al., 2020).

Já em células SH-SY5Y, a fração FrDCM de *T. phaeocarpa* (3,5 log de redução) e a fração FrDCM de *T. glabrescens* (4,0 log de redução) reduziram significativamente a carga viral na maior concentração avaliada (30 μ g/mL) (Figura 65C). A viabilidade celular das células infectadas e tratadas não foi alterada em comparação ao grupo controle (ZIKV+DMSO) (Figura 65A), indicando um efeito antiviral dessas frações.

A atividade anti-ZIKV das frações avaliadas em células Vero resultou em um número maior de frações ativas para ambas as espécies (frações diclorometânica e em acetato de etila) do que na linhagem SH-SY5Y, onde somente as frações diclorometânica foram ativas. As células SH-SY5Y são mais sensíveis e suscetíveis à infecção pelo ZIKV e, portanto, pode-se supor que infecção viral seja mais eficiente nessas células devido ao tropismo por células neuronais (LUPLERTLOP et al., 2017). Este fator é importante para desencadear uma infecção

mais rápida e provavelmente as frações foram menos eficazes em reverter ou minimizar a infecção causada pelo ZIKV.

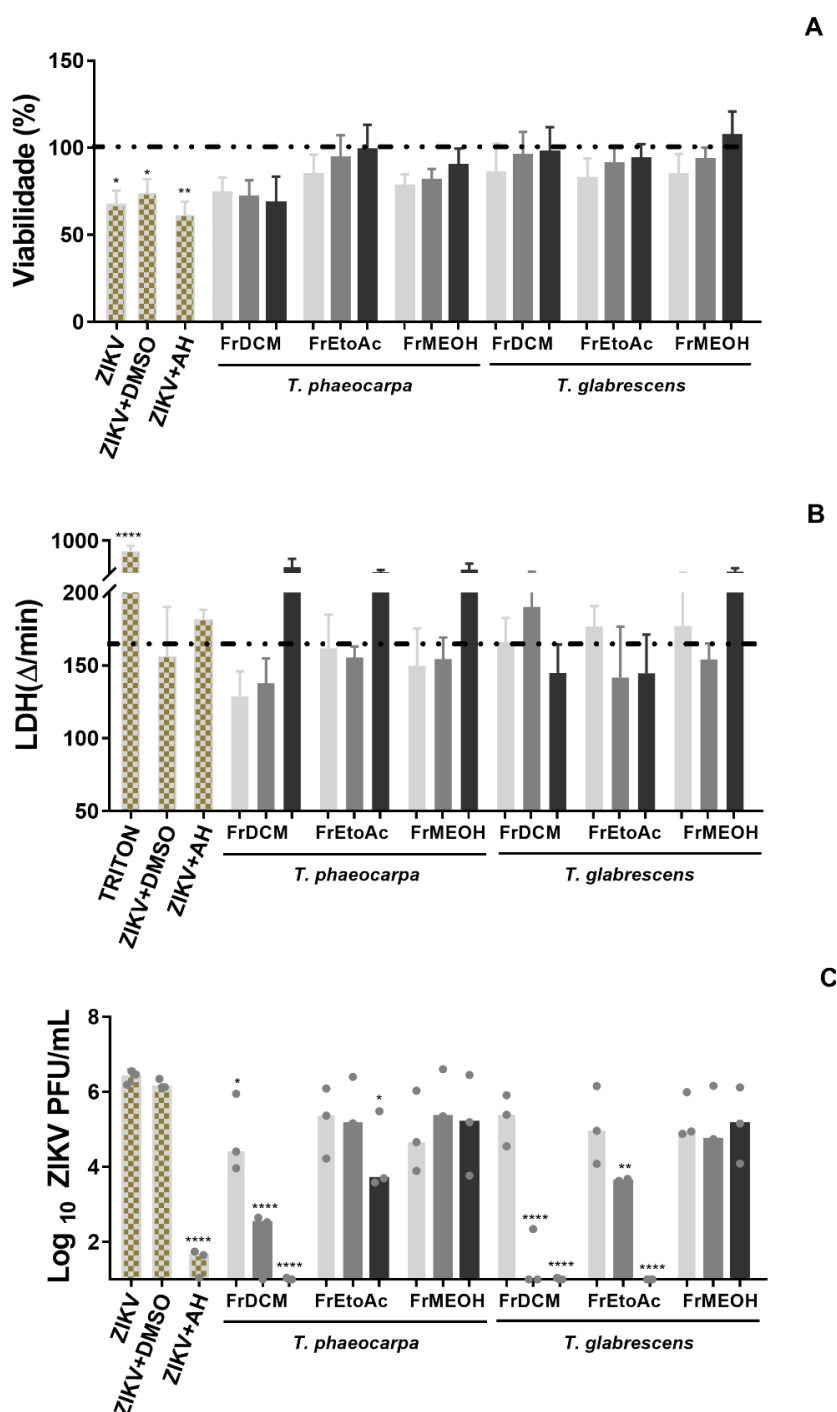


Figura 64. Efeito das frações de *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* frente ao ZIKV, ensaiados em células Vero CCL-81, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).

As frações foram testadas a 3 μg/mL (barras cinza-claras), 10 μg/mL (barras cinza-médio) e 30 μg/mL (barras pretas). Para MTT e LDH, as barras representam valores médios ± SEM, onde * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 versus grupo de controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Para carga viral as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey (ZIKV+tratado versus ZIKV+DMSO), onde * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 e **** p < 0,0001. AH-D foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem a fração e ZIKV.

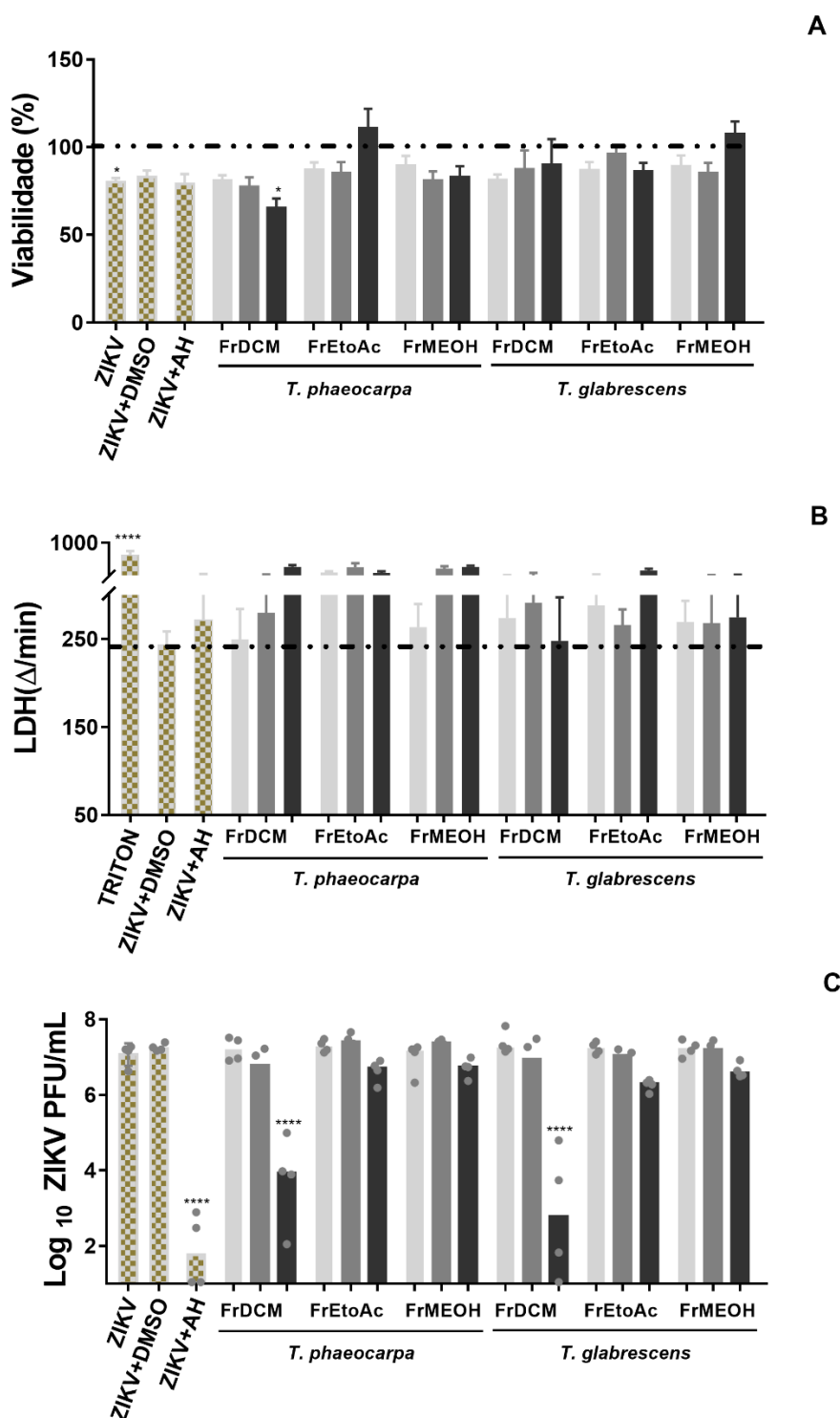


Figura 65. Efeito das frações de *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* frente ao ZIKV, ensaiados em células SH-SY5Y, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).

As frações foram testados a 3 $\mu\text{g/mL}$ (barras cinza-claras), 10 $\mu\text{g/mL}$ (barras cinza-médio) e 30 $\mu\text{g/mL}$ (barras pretas). Para MTT e LDH, as barras representam valores médios \pm SEM, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo de controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Para carga viral as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey (ZIKV+tratado versus ZIKV+DMSO), onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. AH-D foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem a fração e ZIKV.

5.5.3 Viabilidade celular e atividade anti-ZIKV dos compostos isolados em células SH-SY5Y

A viabilidade celular das substâncias isoladas de *T. glabrescens* (GF52, mistura de esteres + friedelina; GF154, glutinol; GF195, mistura de α - e β -amirina; GF231, β -sitosterol) e *M. ilicifolia* (SOL1, friedelan-3 β -ol) foi avaliada nas concentrações de 10 e 30 μ M pelos métodos do MTT e LDH. As substâncias não foram consideradas citotóxicas, incluindo o β -sitosterol que apresentou viabilidade celular em torno de 70 % (Figura 66).

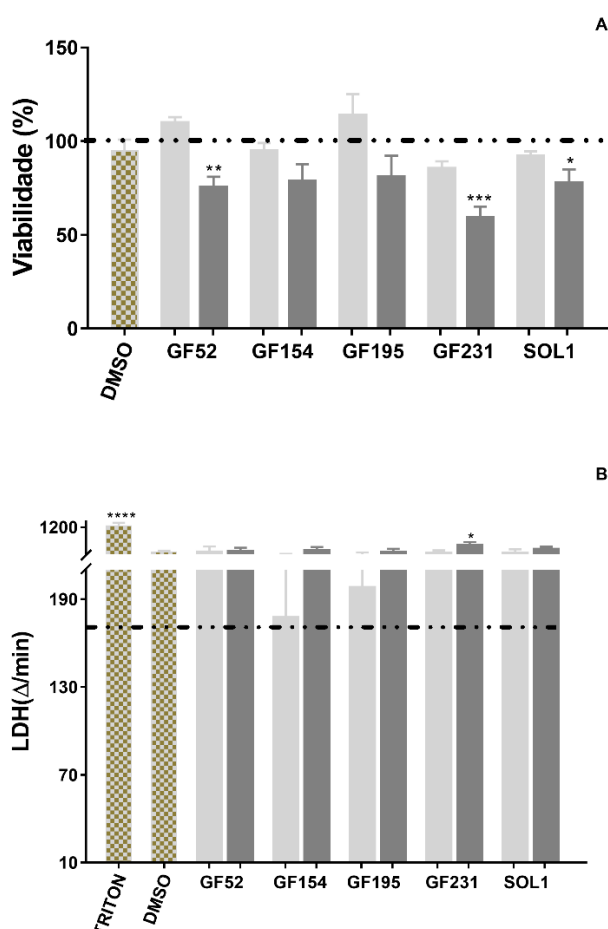


Figura 66. Viabilidade celular das substâncias isoladas de *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* em células SH-SY5Y, empregando os métodos do MTT (A) e LDH (B).

GF52: mistura de esteres + friedelina; GF154: glutinol; GF195: mistura de α - e β -amirina; GF231: β -sitosterol e SOL1: friedelan-3 β -ol. As substâncias foram testadas a 10 μ M (barras cinza-claras) e 30 μ M (barras cinza-médias). As barras representam valores médios \pm SEM, onde * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem substância.

Dentre as substâncias avaliadas, somente β -sitosterol, isolado de *T. glabrescens*, e friedelan-3 β -ol, obtido de *M. ilicifolia*, reduziram significativamente a carga viral na concentração de 30 μ M (redução de 0,9 log e 1,4 log, respectivamente) (Figura 67C). A

viabilidade celular das células infectadas e tratadas não foi alterada em comparação ao grupo controle (ZIKV+DMSO) (Figura 67A), indicando um efeito antiviral desses compostos.

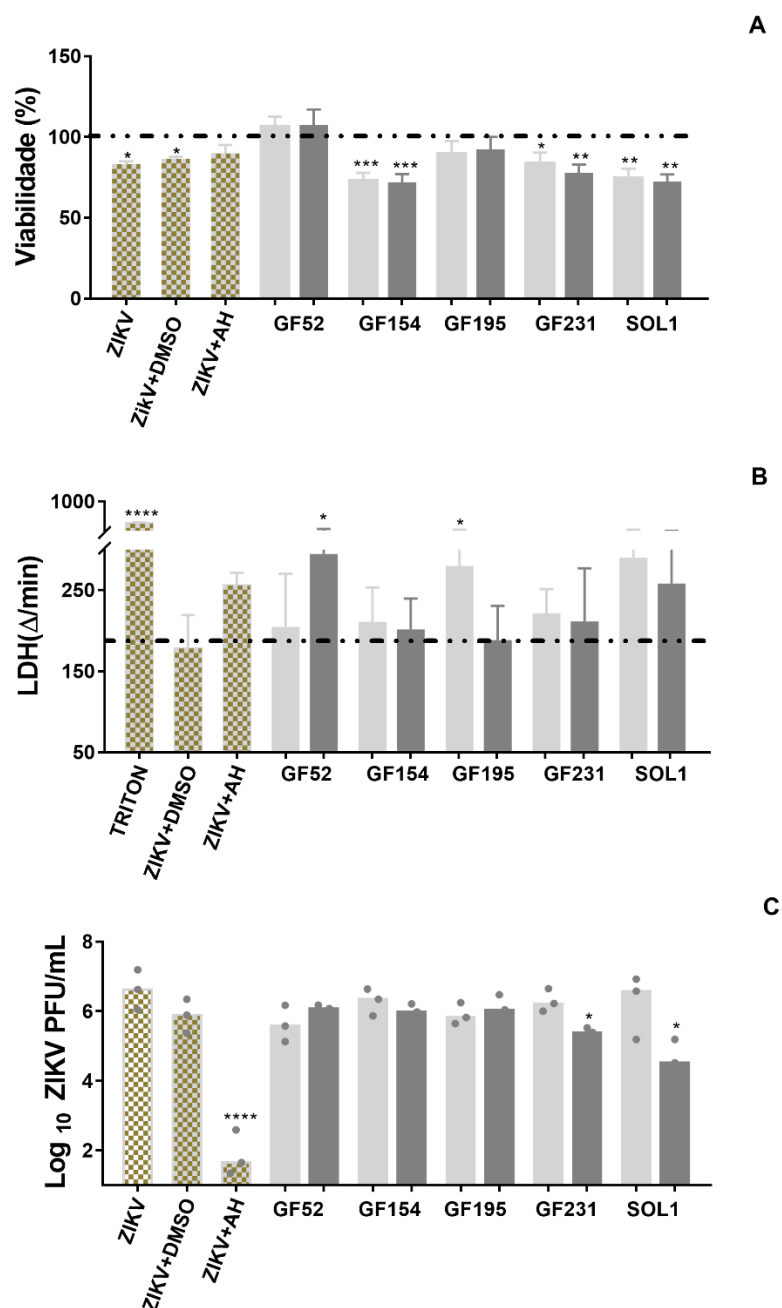


Figura 67. Efeito dos compostos isolados de *T. phaeocarpa* e *M. ilicifolia* frente ao ZIKV, ensaiados em células SH-SY5Y, utilizando os métodos do MTT (A), LDH (B), e determinação da carga viral (C).

GF52: mistura de esteres + friedelina; GF154: glutinol; GF195: mistura de α e β -amirina; GF231: β -sitosterol e SOL1: friedelan-3 β -ol. As substâncias foram testadas a 10 μ M (barras cinza-claro) e 30 μ M (barras cinza médio). Para MTT e LDH, as barras representam valores médios \pm SEM, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus grupo de controle de células. Triton foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Para carga viral as barras representam valores de mediana da triplicata experimental e triplicata biológica. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey (ZIKV+tratado versus ZIKV+DMSO), onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. AH-D foi empregado como controle positivo e DMSO como controle negativo. Linha tracejada = controle de células, sem substância e ZIKV.

Na sequência, procedeu-se com a determinação da concentração citotóxica (CC_{50}), concentração efetiva (CE_{50}) e índice de seletividade (IS) do β -sitosterol e do friedelan- 3β -ol em células SH-SY5Y. As substâncias foram avaliadas em 8 concentrações (300 – 0,1 μ M) empregando o ensaio do MTT e titulação viral. O β -sitosterol apresentou $CC_{50} = >300$ μ M, $CE_{50} = 71,3 \pm 7,1$ μ M e IS = 4,2, enquanto, o friedelan- 3β -ol apresentou $CC_{50} = >300$, μ M $CE_{50} = 58,2 \pm 19,8$ μ M e IS = 5,2. Ambos apresentaram índices de seletividade acima de 4, valor considerado promissor para substâncias antivirais (LYU et al., 2005). Ao comparar os valores determinados para as substâncias isoladas com seus extratos de origem, extrato diclorometânico de *M. ilicifolia* ($CC_{50} = 52,7 \pm 16,7$ μ g/mL, $CE_{50} = 16,8 \pm 10,3$ μ g/mL e IS = 3,4) e extrato etanólico de *T. glabrescens* ($CC_{50} = 130,2 \pm 27,5$ μ g/mL, $CE_{50} = 20,4 \pm 10,2$ μ g/mL e IS = 6,4), observa-se uma redução da atividade antiviral, mas a citotoxicidade também foi diminuída. Esses resultados sugerem a presença de outros compostos bioativos, além dos isolados, nos extratos e frações de *M. ilicifolia* e *T. glabrescens*. Também é factível supor a existência sinergismo entre os constituintes dos extratos e frações avaliados, o que explicaria sua maior atividade antiviral. O óleo essencial das partes aéreas de *Ayapana triplinervis* não foi citotóxico para as células A549 e mostrou atividade anti-ZIKV ($CE_{50} = 38$ μ g/mL, IS = 12,5). Já o isolado, éter dimetiltio-hidroquinona, do óleo essencial de *A. triplinervis*, também mostrou atividade antiviral contra ZIKV ($CE_{50} = 45$ μ g/mL, IS = 9,1) (HADDAD et al., 2019b).

Vale ressaltar que não foram encontrados relatos na literatura sobre a avaliação da atividade antiviral do β -sitosterol e do friedelan- 3β -ol frente ao ZIKV em células SH-SY5Y, evidenciando o promissor potencial antiviral dessas substâncias. O β -sitosterol foi ativo contra o vírus do herpes simples tipo 2 em células Vero, apresentando $CC_{50} = 212,8$ μ g/mL, $CE_{50} = 2,7$ μ g/mL e IS = 76,2 (TOUJANI et al., 2018). Por sua vez, para o friedelan- 3β -ol não foram encontrados relatos na literatura de atividade antiviral.

6 CONCLUSÃO

A abordagem quimiosistemática mostrou-se adequada para a seleção de espécies vegetais com atividade anti-ZIKV, uma vez que aproximadamente 35% dos extratos testados foram ativos em células Vero CCL-81 infectadas com ZIKV. As células neuronais SH-SY5Y infectadas com ZIKV foram menos responsivas ao tratamento do que a linhagem de células Vero CCL-81. Os extratos de *M. ilicifolia* (diclorometânico), *T. phaeocarpa*, *T. glabrescens*, *M. rigida* e *E. grandiflorus* apresentaram atividade anti-ZIKV em células SH-SY5Y. Esses extratos reduziram a carga viral e a morte celular, mantendo ou restaurando a viabilidade celular.

Os valores de CC_{50} determinados para os extratos selecionados indicaram que as células neuronais SH-SY5Y foram mais sensíveis ao dano celular induzido, quando comparado à linhagem Vero CCL-81. Os extratos avaliados não atuaram nas etapas de adsorção e internalização do ZIKV em células Vero CCL-81. Os índices de seletividade (IS) determinados em células SH-SY5Y para os extratos de *M. ilicifolia*, *T. phaeocarpa* e *T. glabrescens* (IS de 3,4, 4,8 e 6,4, respectivamente) indicam esses extratos como fontes de constituintes antivirais.

A caracterização química por UPLC-DAD-ESI-MS/MS do extrato diclorometânico de *M. ilicifolia* resultou na identificação de triterpenos (ácido ursólico, ácido betulínico, friedelina, friedelinol, lupeol e amirina), enquanto 27 compostos fenólicos foram identificados no extrato etanólico de *T. glabrescens*. A análise da composição química das frações oriundas de *T. glabrescens* e *M. ilicifolia* por CG-EM revelou composição semelhante, com a identificação de 10 compostos, sendo seis ésteres, um álcool, um triterpeno e dois hidrocarbonetos. O estudo fitoquímico de *T. glabrescens* resultou no isolamento e caracterização estrutural de glutinol, β -sitosterol e de uma mistura de α - e β -amirina. Já a investigação fitoquímica de *M. ilicifolia* forneceu o friedelan-3 β -ol.

As frações FrDCM e FrEtOAc de *T. glabrescens* e *M. ilicifolia*, apresentaram atividade anti-ZIKV em células Vero CCL-81. Já em células SH-SY5Y, foram ativas somente as frações FrDCM de *T. glabrescens* e *M. ilicifolia*. β -sitosterol isolado de *T. glabrescens* e friedelan-3 β -ol isolado de *M. ilicifolia* apresentaram atividade anti-ZIKV em células SH-SY5Y, a 30 μ M, com índice de seletividade de 4,20 e 5,15, respectivamente.

Portanto, os resultados obtidos evidenciam o potencial promissor dos extratos de *M. ilicifolia* e *T. glabrescens* como fontes de produtos naturais ativos contra o ZIKV, especialmente triterpenos e esteróis.

REFERÊNCIAS

- ACQUADRO, S.; CIVRA, A.; CAGLIERO, C.; MARENCO, A.; RITTA, M.; FANCESE, R.; SANNA, C.; BERTEA, C.; SGORBINI, B.; LEMBO, D.; DONALISIO M.; RUBIOLO, P. *Punica granatum* leaf ethanolic extract and ellagic acid as inhibitors of *Zika virus* infection. *Planta Medica*, 86(18):1363-1374, 2020. doi: 10.1055/a-1232-5705
- ALMEIDA, M.F.O.; MELO, A.C.R.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; AMARAL, A.C.F.; MACHADO, G.M.C.; LEON, L.L.P. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova*, 34(7):1182-1187, 2011. doi: 10.1590/S0100-40422011000700015
- ANSELL, S.M.; PEGEL, K.H.; TAYLOR, D.A.H. Diterpenes from the timber of 20 *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 32:953-959, 1993. doi: 10.1016/0031-9422(93)85235-J
- APTE-SENGUPTA, S.; SIROHI, D.; KUHN, R.J. Coupling of Replication and Assembly in *Flaviviruses*. *Current Opinion in Virology*, 134-42, 2014. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.020
- ARAÚJO, D.S.; CHAVES, M.H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. *Química Nova*, 28(6):996-999, 2005. doi: 10.1590/s0100-40422005000600012
- ARAÚJO, M.F.; SANTOS, C.B.; CAVALCANTI, J.F.; PEREIRA, F.S.; MENDES, G.S.; WERLE, A.A.; ROMANOS, M.T.V.; CARVALHO, M.G. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(12):2489-2493, 2011. Disponível em: <
https://www.academia.edu/25272841/Proposed_active_compounds_from_Ouratea_parviflora> acessado em: 11:05/2020.
- ATTA-UR-RAHMAN; ZAREEN, S.; CHOUDHARY, M.I.; NGOUNOU, F.N.; YASIN, A.; PARVEZ, M. Terminalin A, a novel triterpenoid from *Terminalia glaucescens*. *Tetrahedron Letters*, 43(35):6233-6236, 2002. doi: 10.1016/S0040-4039(02)01330-8
- BAG, P.; CHATTOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, H.; OJHA, D.; MANDAL, N.; SARKAR, M.C.; CHATTERJEE, T.; DAS, G.; CHAKRABORTI, S. Anti-herpes virus activities of bioactive fraction and isolated pure constituent of *Mallotus peltatus*: an ethnomedicine from Andaman Islands. *Virology Journal*, 9, 98, 2012. doi: 10.1186/1743-422X-9-98
- BAJKACZ, S.; BARANOWSKA, I.; BUSZEWSKI, B.; KOWALSKI, B.; LIGOR, M. Determination of flavonoids and phenolic acids in plant materials using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS method. *Food Analytical Methods*, 11, 3563-3575, 2018. doi: 10.1007/s12161-018-1332-9
- BARAN, L.C.P.; COSTA, M.F.; VIDAL, K.S.; DAMICO, F. M.; BARBONI, M.T.S.; LIMA, D.S.; FRANÇA, V.C.R.M.; MARTINS, C.M.G.; TABARES, H.S.; DIAS, S.L.; SILVA, L.A.; DECLEVA, D.; HAMER, R.D.; ZATZ, M.; BERTOZZI, A.P.; GAZETA, R.E.; PASSOS, S.D.; VENTURA, D.F. Alterations in visual acuity and visual development in infants 1-24 months old either exposed to or infected by *Zika virus* during gestation, with and without microcephaly. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology*, 23(4):215.e1-215.e7, 2019. doi: 10.1016/j.jaapos.2019.03.005
- BARBOSA, E. C.; ALVES, T.M.A.; KOHLHOFF, M.; JANGOLA, S.T.O.; PIRES, D.E.V.; FIGUEIREDO, A.C.C.; ALVES, E.A.R.; CALZAVARA-SILVA, C.E.; SOBRAL, M.; KROON, E.G.; ROSA, L.H.; ZANI, C.L.; OLIVEIRA, J.G. Searching for plant-derived antivirals against *Dengue virus* and *Zika virus*. *Virology Journal*, 19:31, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01751-z>

- BARROS, I.M.C. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2008. 194p. Disponível em: < <https://repositorio.unb.br/handle/10482/4709> > acessado em: 30/04/2020.
- BÁSIC, M.; ELGNER, F.; BENDER, D.; SABINO, C.; HERRLEIN, M-L.; ROTH, H.; GLITSCHER, M.; FATH, A.; KERL, T.; SCHMALZ, H-G.; HILDT, E. A synthetic derivative of houttuynoid B prevents cell entry of *Zika virus*. *Antiviral Research* 172,104644, 2019. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104644
- BAYER, A.; LENNEMANN, N.J.; OUYANG, Y.; BRAMLEY, J.C.; MOROSKY, S.; JR MARQUES, E.T.A.; CHERRY, S.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C.B. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against *Zika virus* infection. *Cell host & microbe*, 19(5)705-712, 2016. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.008
- BAZ, M.; BOIVIN, G. Antiviral agents in development for *Zika virus* infections. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 12(3)101, 2019. doi: 10.3390/ph12030101
- BERNATCHEZ, J.A.; YANG, Z.; COSTE, M.; LI, J.; BECK, S.; LIU, Y.; CLARK, A.E.; ZHU, Z.; LUNA, L.A.; SOHL, C.D.; PURSE, B.W.; LI, R.; SIQUEIRA-NETO, J.L. Development and validation of a phenotypic high-content imaging assay for assessing the antiviral activity of small-molecule inhibitors targeting *Zika virus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(10):e00725-18, 2018. doi: 10.1128/AAC.00725-18
- BESERRA, A.M.S.E.S.; VILEGAS, W.; TANGERINA, M.M.P.; ASCÊNCIO, S.D.; SOARES, I.M.; PAVAN, E.; DAMAZO, A.S.; RIBEIRO, R.V.; MARTINS, D.T.O. Chemical characterisation and toxicity assessment *in vitro* and *in vivo* of the hydroethanolic extract of *Terminalia argentea* Mart. leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 227:56-68, 2018. doi:10.1016/j.jep.2018.08.025
- BETANCUR-GALVIS, L.A.; MORALES, G.E.; FORERO, J.E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(4)541-546, 2002. doi: 10.1590/S0074-02762002000400017
- BIESKI, I.G.; RIOS SANTOS, F.; DE OLIVEIRA, R.M.; ESPINOSA, M.M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U.P.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2012:272749, 2012. doi: 10.1155/2012/272749
- BOHLMANN F.; ZDERO C.; KING R.M.; ROBINSON H. Thirteen kolavane derivatives from *Symphyopappus species*. *Phytochemistry*, 20(7)1657-1663, 1981. doi: 10.1016/S0031-9422(00)98550-9
- BOHLMANN, F.; TRINKS, C.; JAKUPOVIC, J.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Isolation of a guaianolide from *Symphyopappus compressus*. *Planta Medica*, 50(3):276-277, 1984. doi: 10.1055/s-2007-969702
- BRASIL, P.; PEREIRA, J.P.; MOREIRA, M.E.; RIBEIRO NOGUEIRA, R.M.; DAMASCENO, L.; WAKIMOTO, M.; NOGUEIRA, R.M.R.; SEQUEIRA, P.C.; SIQUEIRA, A.M.; CARVALHO, L.M.A.; CUNHA, D.C.; CALVET, G.A.; NEVES, E.S.; MOREIRA, M.E.; BAIÃO, A.E.R.; CARVALHO, P.R.N.; JANZEN, C.; VALDERRAMOS, S.G.; CHERRY, J.D.; FILIPPIS, A.M.B.; NIELSEN-SAINES, K. *Zika virus* infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375(24)2321-2334, 2016. doi: 10.1056/nejmoa1602412
- BRAZ-DE-MELO, H.A.; PASQUARELLI-DO-NASCIMENTO, G.; CORRÊA, R.; ALMEIDA, R.N.; SANTOS, I.O.; PRADO, P.S.; PICCOLO, V.; BEM, A.F.; PIZATO, N.; MAGALHÃES, K.G. Potential neuroprotective and anti-inflammatory effects provided by omega-3 (DHA) against *Zika virus* infection in human SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*, 9(1):20119, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-56556-y

- BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68(5):445-448, 2002. doi:10.1055/s-2002-32073
- BYLER, K.G.; OGUNGBEB, I.V.; SETZERA, W.N. *In-silico* screening for anti-*Zika virus* phytochemicals. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 69:78-91, 2016. doi: 10.1016/j.jmgm.2016.08.011
- CALLAND, N.; ALBECKA, A.; BELOUZARD, S.; WYCHOWSKI, C.; DUVERLIE, G.; DESCAMPS, V.; HOBER, D.; DUBUISSON, J.; ROUILLÉ, Y.; SÉRON, K. (-) - A epigallocatequina-3-galato é um novo inibidor da entrada do vírus da hepatite C. *Hepatology*, 55(3)720-729, 2011. doi: 10.1002/hep.24803
- CAMARGOS, V.N.; FOUREAUX, G.; MEDEIROS, D.C.; DA SILVEIRA, V.T.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; MATOSINHOS, A.; FIGUEIREDO, A.; SOUSA, C.; MOREIRA, T.P.; QUEIROZ, V.F.; DIAS, A.; SANTANA, K.; PASSOS, I.; REAL, A.; SILVA, L.C.; MOURÃO, F.; WNUK, N.T.; OLIVEIRA, M.; MACARI, S.; SILVA, T.; GARLET, G.P.; JACKMAN, J.A.; SORIANI, F.M.; MORAES, M.F.D.; MENDES, E.M.A.M.; RIBEIRO, F.M.; COSTA, G.M.J.; TEIXEIRA, A.L.; CHO, N-J.; OLIVEIRA, A.C.P.; TEIXEIRA, M.M.; COSTA, V.V.; SOUZA, D. G. In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBioMedicine*, 44:516-529, 2019. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.014
- CAMPOS, R. D. M.; CIRNE-SANTOS, C.; MEIRA, G.L.S.; SANTOS, L.L.R.; MENESES, M.D.; FRIEDRICH, J.; JANSEN, S.; RIBEIRO, M.S.; CRUZ, I.C.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; FERREIRA, D.S. Prolonged detection of *Zika virus* RNA in urine samples during the ongoing *Zika virus* epidemic in Brazil. *Journal of Clinical Virology*, 77:69-70, 2016. doi: 10.1016/j.jcv.2016.02.009
- CAO-LORMEAU, V.M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTÈRE, S.; ROCHE, C.; VANHOMWEGEN, J.; DUB, T.; BAUDOUIN, L.; TEISSIER, A.; LARRE, P.; VIAL, A.L.; DECAM, C.; CHOUMET, V.; HALSTEAD, S.K.; WILLISON, H.J.; MUSSET, L.; MANUGUERRA, J.C.; DESPRES, P.; FOURNIER, E.; MALLET, H.P.; MUSSO, D.; FONTANET, A.; NEIL, J.; GHAWCHÉ, F. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with *Zika virus* infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 387(10027)1531-1539, 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00562-6
- CAO-LORMEAU, V.M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E.; BERRY, A.L.; MALLET, H.P.; SALL, A.A.; MUSSO, D. *Zika virus*, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, 20(6)1085-1086, 2014. doi: 10.3201/eid2006.140138
- CARDOSO, C.W.; PAPLOSKI, I.A.D.; RODRIGUES, M.S.; SILVA, M.M.O.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I.; KITRON, U.; REIS, M.G.; RIBEIRO, G.S. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2)2274-2276, 2015. doi: 10.3201/eid2112.151167
- CARNEIRO, B.M.; BATISTA, M.N.; BRAGA, A.; NOGUEIRA, M.L.; RAHAL, P. The green tea molecule EGCG inhibits *Zika virus* entry. *Virology*, 496, 215-218, 2016. doi: 10.1016/j.virol.2016.06.012
- CAUCHEMEZ, S.; BESNARD, M.; BOMPARD, P.; DUB, T.; GUILLEMETTE-ARTUR, P.; EYROLLE-GUIGNOT, D.; SALJE, H.; VAN KERKHOVE, M.D.; ABADIE, V.; GAREL, C.; FONTANET, A.; MALLET, H.P. Association between *Zika virus* and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *Lancet*, 387(10033)2125-2132, 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00651-6
- CAVALCANTE, B.R.R.; ARAGÃO-FRANÇA, L.S.; SAMPAIO, G.L.A.; NONAKA, C.K.V.; OLIVEIRA, M.S.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I.; DIAS, B.R.S.; MENEZES, J.P.B.;

- ROCHA, V.P.C.; ROSSI, E.A.; PAREDES, B.D.; MARTINS, G.L.S.; ALLAHADADI, K.J.; PEIXOTO, L.R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOUZA, B.S.F.; SOARES, M.B.P. Betulinic acid exerts cytoprotective activity on *Zika virus* infected neural progenitor cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 558324, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.558324
- CAYME, J-M.C.; RAGASA, C.Y. Structure elucidation of β -stigmasterol and β -sitosterol from *Sesbania grandiflora* (Linn.) Pers. and β -carotene from *Heliotropium indicum* Linn. by NMR spectroscopy. *Kimika*, 20(112):5-12 (2004). Disponível em: < <https://kimika.pfcs.org.ph/index.php/kimika/article/view/140/142> > acessado em: 20/03/2022.
- CHAN, J.F.-W.; YIP, C.C.-Y.; TSANG, J.O.-L.; TEE, K.-M.; CAI, J.-P.; CHIK, K.K.-H.;...YUEN, K.-Y. Differential cell line susceptibility to the emerging *Zika virus*: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerging Microbes & Infections*, 5(8):e93–e93, 2016. doi:10.1038/emi.2016.99
- CHANG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, W.; ZHOU, K.; JIAN, P.; SHE, G.; ZHANG, L. A comprehensive review of the structure elucidation of tannins from *Terminalia* Linn. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2019:8623909, 2019. doi:10.1155/2019/8623909
- CHARLES, A.S.; CHRISTOFFERSON, R.C. Utility of a dengue-derived monoclonal antibody to enhance *Zika* infection *in vitro*. *PLoS currents*, 2016. doi: 10.1371/currents.outbreaks.4ab8bc87c945eb41cd8a49e127082620
- CHAUHAN, S.M.S.; PARKASH, S.; KAUSHIK, R. Isolation of 3 β -hydroxyolean-12-ene and related triterpenoids from the leaves of *Terminalia arjuna*. *Indian Journal of Chemistry*, 368:297-298, 1997. Disponível em: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/57065/1/IJCB%2036B%283%29%20297-298.pdf> > acessado em: 25/03/2022.
- CHENG, H.Y.; LIN, C.C.; LIN, T.C. Anti-herpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. *Antiviral Research*, 55(3):447-455, 2002. doi: 10.1016/s0166-3542(02)00077-3
- CHIANG, L.C.; NG, L.T.; CHENG, P.W.; CHIANG, W.; LIN, C.C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 32(10):811-816, 2005. doi: 10.1111/j.1440-1681.2005.04270.x
- CHO, N.J.; DVORY-SOBOL, H.; XIONG, A.; CHO, S.J.; FRANK, C.W.; GLENN, J.S. Mechanism of an amphipathic alpha-helical peptide's antiviral activity involves size-dependent virus particle lysis. *ACS Chemical Biology*, 4(12):1061-1067, 2009. doi:10.1021/cb900149b
- CIRNE-SANTOS, C.C.; BARROS, C.S.; NOGUEIRA, C.C.R.; AMORIM, L.S.C.; CAMPOS, R.M.; RATCLIFFE, N.A.; TEIXEIRA, V.L.; FERREIRA, D.F.; PAIXÃO, I.C.N.P. Antiviral effect of the seaweed *Osmundaria obtusiloba* against the *Zika virus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 12(25)387-395, 2018. doi: 10.5897/JMPR2018.6624
- CLAIN, E.; HADDAD, J.G.; KOISHI, A.C.; SINIGAGLIA, L.; RACHIDI, W.; DESPRÈS, P.; N. DUARTE DOS SANTOS, C.; GUIRAUD, P.; JOUVENET, N.; EL KALAMOUNI, C. The polyphenol-rich extract from *Psiloxylon mauritianum*, an endemic medicinal plant from Reunion Island, inhibits the early stages of *Dengue* and *Zika virus* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8): 1860, 2019. doi:10.3390/ijms20081860
- CLAIN, E.; SINIGAGLIA, L.; KOISHI, A.C.; GORGETTE, O.; GADEA, G.; VIRANAICKEN, W.; KREJBICH-TROTOT, P.; MAVINGUI, P.; DESPRÈS, P.;

- SANTOS, C.N.D.; GUIRAUD, P.; JOUVENET, N.; EL KALAMOUNI, C. Extract from *Aphloia theiformis*, an edible indigenous plant from Reunion Island, impairs *Zika virus* attachment to the host cell surface. *Scientific Reports*, 8(1):10856, 2018. Published 2018 Jul 18. doi:10.1038/s41598-018-29183-2
- CORDEIRO, P.J.M.; VILEGAS, J.H.Y.; LANCAS, F.M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira santa"). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 10(6):523-526, 1999. doi: 10.1590/S0103-50531999000600017
- COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of ethnopharmacology*, 106(3):290-302, 2006. doi: 10.1016/j.jep.2006.04.003
- COSTA, P.M.; FERREIRA, P.M.; BOLZANI, V.; FURLAN, M.; DE FREITAS FORMENTON MACEDO DOS SANTOS, V.A.; CORSINO, J.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. *Toxicology in Vitro*, 22(4):854-863, 2008. doi:10.1016/j.tiv.2008.01.003
- COSTA, V.V.; DEL SARTO, J.L.; ROCHA, R.F.; SILVA, F. R.; DORIA, J. G.; OLMO, I. G.; MARQUES, R. E.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; FOUREAUX, G.; ARAÚJO, J.; CRAMER, A.; REAL, A.; RIBEIRO, L. S.; SARDI, S. I.; FERREIRA, A. J.; MACHADO, F. S.; DE OLIVEIRA, A. C.; TEIXEIRA, A. L.; NAKAYA, H. I.; SOUZA, D. G.; RIBEIRO, F.M.; TEIXEIRA, M.M. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor blockade prevents neuronal death induced by *Zika virus* infection. *mBio*, 8(2):e00350-17, 2017. doi: 10.1128/mBio.00350-17
- COYNE, C.B.; LAZEAR, H.M. *Zika virus* - reigniting the TORCH. *Nature reviews. Microbiology*, 14(11):707-715. doi: 10.1038/nrmicro.2016.125
- CRUZ, W.S.C.; FERRAZ, A.C.; LIMA, W.G.; MORAES, T.F.S.; FERREIRA, F.L.; FERREIRA, J.M.S.; MAGALHÃES, C.L.B.; DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A.; MAGALHÃES, J.C. Evaluation of the activity of *Tontelea micrantha* extracts against bacteria, *Candida* and *Mayaro virus*. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 9(1):21-26, 2018. doi: 10.4103/jpnr.JPNR_8_18
- DAEP, C.A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L.; EUGENIN, E.A. *Flaviviruses*, an expanding threat in public health: focus on *Dengue*, *West Nile* and *Japanese encephalitis virus*. *Journal of Neurovirology*, 20(6):539-60, 2014. doi: 10.1007/s13365-014-0285-z2014
- DE OLIVEIRA, D. M.; SILVA, G.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acanthophylla* Reissek (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, (8), 661-665, 2006. doi: 10.1016/j.bse.2006.03.002
- DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1):61-9, 1988. doi:10.1016/0022-1759(88)90310-9
- DELVECCHIO, R.; HIGA, L.M.; PEZZUTO, P.; VALADÃO, A.L.; GARCEZ, P.P.; MONTEIRO, F.L.; LOIOLA, E.C.; DIAS, A.A.; SILVA, F.J.; ALIOTA, M.T.; CAINE, E.A.; OSORIO, J.E.; BELLIO, M.; O'CONNOR, D.H.; REHEN, S.; DE AGUIAR, R.S.; SAVARINO, A.; CAMPANATI, L.; TANURI, A. Chloroquine, an endocytosis blocking agent, inhibits *Zika virus* infection in different cell models. *Viruses*, 8(12):322, 2016. doi: 10.3390/v8120322
- DIAS, M.O.; HAMERSKI, L.; PINTO, A.C. Separação semipreparativa de α e β -amirina por cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, 34(4):704-706, 2011. doi: 10.1590/S0100-40422011000400026

- DICK, G.W.; KITCHEN, S.F.; HADDOW, A.J. *Zika virus* (I). Isolations and serological specificity. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 46(5):509-520, 1952. doi: 10.1016/0035-9203(52)90042-4
- DINDA, B.; DAS, N.; DINDA, S.; DINDA, M.; SILSARMA, I. The genus *Sida L.* a traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry. Journal of Ethnopharmacology, 176:135-76, 2015. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.027
- DUFFY, M.R.; CHEN, T.H.; HANCOCK, W.T.; POWERS, A.M.; KOOL, J.L.; LANCIOTTI, R.S.; PRETRICK, M.; MARFEL, M.; HOLZBAUER, S.; DUBRAY, C.; GUILLAUMOT, L.; GRIGGS, A.; BEL, M.; LAMBERT, A.J.; LAVEN, J.; KOSOY, O.; PANELLA, A.; BIGGERSTAFF, B.J.; FISCHER, M.; HAYES, E.B. *Zika virus* outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. The New England journal of medicine, 360(24):2536-2543, 2009. doi: 10.1056/NEJMoa0805715
- DWEVEDI, A.; DWIVEDI, R.; SHARMA, Y.K. Exploration of phytochemicals found in *Terminalia* sp. and their antiretroviral activities. Pharmacognosy reviews, 10(20):73-83, 2016. doi: 10.4103/0973-7847.194048
- EBAJO JR., V.D.; SHEN, C-C; RAGASA, C.Y. Terpenoids and Sterols from *Hoya multiflora* Blume. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5(4):033-039, 2015. doi: 10.7324/JAPS.2015.50406
- ELGNER, F.; SABINO, C.; BASIC, M.; PLOEN, D.; GRÜNWELLER, A.; HILDT, E. Inhibition of *Zika virus* replication by Silvestrol. Viruses, 10(4):149, 2018. doi:10.3390/v10040149
- ENDRINGER, D.C.; PEZZUTO, J.M.; SOARES, C.M.; BRAGA, F.C. L-(+)-bornesitol. Acta Crystallographica Section, 63(2): o1067-o1068, 2007. doi: 10.1107/S1600536806037019
- ESTOPPEY, D.; LEE, C.M.; JANOSCHKE, M.; LEE, B.H.; WAN, K.F.; DONG, H.; MATHYS, P.; FILIPUZZI, I.; SCHUHMANN, T.; RIEDL, R.; AUST, T.; GALUBA, O.; MCALLISTER, G.; RUSS, C.; SPIESS, M.; BOUWMEESTER, T.; BONAMY, G.M.C.; HOEPFNER, D. The natural product Cavinafungin selectively interferes with *Zika* and *Dengue virus* replication by inhibition of the host signal peptidase. Cell Reports, 19(3):451-460, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.071
- estSAGER, G.; GABAGLIO, S.; SZTUL, E.; BELOV, G.A. Role of host cell secretory machinery in *Zika virus* life cycle. Viruses, 10(10):559, 2018. doi:10.3390/v10100559
- EVANS, W.C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxylon*. Journal of Ethnopharmacology, 3(2-3):265-77, 1981. doi: 10.1016/0378-8741(81)90057-x
- FAGBAMI, A. H. *Zika virus* infections in Nigeria: Virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. Journal of Hygiene, 83(2):213-9, 1979. doi: 10.1017/s0022172400025997
- FAHMY, N.M.; AL-SAYED, E.; SINGAB, A.N. Genus *Terminalia*: A phytochemical and biological review. Medicinal & Aromatic Plants, 4:1-21, 2015. doi: 10.4172/2167-0412.1000218
- FAIÇAL, A. V.; DE OLIVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, J.; DE ALMEIDA, B. L.; AGRA, I. A.; ALCANTARA, L.; ACOSTA, A. X.; DE SIQUEIRA, I. C. Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to *Zika virus*. BMJ Paediatrics Open, 3(1):e000486, 2019. doi: 10.1136/bmjpo-2019-000486
- FARIA, N.R.; AZEVEDO, R.S.S.; KRAEMER, M.U.G.; SOUZA, R.; CUNHA, M.S.; HILL, S.C.; THEZÉ, J.; BONSALE, M.B.; BOWDEN, T.A.; RISSANEN, I.; ROCCO, I.M.; NOGUEIRA, J. S.; MAEDA, A.Y.; VASAMI, F.G.S.; MACEDO, F.L.L.; SUZUKI, A.; RODRIGUES, S.G.; CRUZ, A.C.R.; NUNES, B.T.; MEDEIROS, D.B.A.; RODRIGUES, D.S.G.; QUEIROZ, A.L.N.; SILVA, E.V.P.; HENRIQUES, D.F.; ROSA,

- E.S.T.; OLIVEIRA, C.S. *Zika virus* in the Americas: early epidemiological and genetic findings. *Science*, 352(6283):345-349, 2016. doi: 10.1126/science.aaf5036
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. *Zika virus* in the Americas - yet another arbovirus threat. *New England Journal of Medicine*, 374(7):601-4, 2016. doi: 10.1056/NEJMp1600297
- FAUCI, A.S. Research conducted and supported by the National Institutes of Health (NIH) in addressing *Zika virus* disease before Committee on Energy and Commerce. Assistant Secretary for Legislation (ASL), 2017. Disponível em: <<https://www.hhs.gov/about/agencies/asl/testimony/2017-05/research-conducted-and-supported-nih.html>> acessado em: 01/05/2020.
- FAYE, O.; FREIRE, C.C. M.; IAMARINO, A.; FAYE, O.; OLIVEIRA, J.V.C.; DIALLO, M.; ZANOTTO, P.M.A.; SALL, A.A. Molecular evolution of *Zika virus* during its emergence in the 20(th) century. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 8(1)2636, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636
- FEITOSA, I.M.L.; SCHULER-FACCINI, L.; SANSEVERINO, M.T.V. Aspectos importantes da Síndrome da Zika Congênita para o pediatra e o neonatologista. *Boletim Científico de Pediatria*, v. 5, n. 3, 2016. doi: 2238-0450/16/05-03/75
- FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A.G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1)73-80, 2003. doi: 10.1016/S0378-8741(03)00259-9
- FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. *Zika virus* infection: an update. *Microbes and Infection*, 21(8-9):353-360, 2019. doi: 10.1016/j.micinf.2019.04.005
- FERRAZ, A.C.; MORAES, T.; NIZER, W.; SANTOS, M.D.; TÓTOLA, A.H.; FERREIRA, J.; VIEIRA-FILHO, S.A.; RODRIGUES, V.G.; DUARTE, L.P.; DE BRITO MAGALHÃES, C.L.; DE MAGALHÃES, J. C. Virucidal activity of proanthocyanidin against *Mayaro vírus*. *Antiviral Research*, 168:76-81, 2019. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.05.008
- FERREIRA, F.L.; HAUCK, M.S.; DUARTE, L.P.; MAGALHÃES, J.C.; SILVA, L.S.M.; PIMENTA, L.P.S.; LOPES, J.C.D.; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; VIEIRA FILHO, S.A. *Zika virus* activity of the leaf and branch extracts of *Tontelea micrantha* and its hexane extracts phytochemical study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(4)793-803, 2019. doi: 10.21577/0103-5053.20180210
- FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M.; DUARTE, L.P.; SILVA, R.P.; JORGE, R.M.; TAGLIATI, C.A.; ZANI, C.L.; ALVES, T.M.A.; PERES, V.; VIEIRA FILHO, S.A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. *Química Nova*, 30(4)842-847, 2007. doi: 10.1590/S0100-40422007000400016
- FORTIN, H.; VIGOR, C.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; ROBIN, V.; LE BOSSÉ, B.; BOUSTIE, J.; AMOROS, M. *In vitro* antiviral activity of thirty-six plants from la Réunion Island. *Fitoterapia*, 73(4):346-50, 2002. doi: 10.1016/s0367-326x(02)00080-1
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2):171-7, 2006. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- FRAGA, B.M.; REINA, M.; LUIS, J.G.; RODRIGUEZ, M.L. Rhoiptelenol and Rhoiptelenone, Two Pentacyclic Triterpenes from *Sideritis macrostachya*. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 58(9-10):621-625, 2003. doi: 10.1515/znc-2003-9-1002

- GARCEZ, F.R.; GARCEZ, W.S.; MIGUEL, D.L.S.; SEREA, A.A.T.; PRADO, F.C. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 14(3):461-465, 2003. doi: 10.1590/S0103-50532003000300021
- GARCÍA, M. DONADEL, O. J.; ARDANAZ, C. E.; TONN, C. E.; SOSA, M. E. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. Pest Management Science, 61(6):612-8, 2005. doi: 10.1002/ps.1028
- GAUDRY, A.; BOS, S.; VIRANAICKEN, W.; ROCHE, M.; KREJBICH-TROTOT, P.; GADEA, G.; DESPRÈS, P.; EL-KALAMOUNI, C. The flavonoid isoquercitrin precludes initiation of *Zika virus* infection in human cells. International journal of molecular sciences, 19(4), 1093, 2018. doi: 10.3390/ijms19041093
- GERLACH, A.D.C.L.; GADEA, A.; SILVEIRA, R.M.B.D.; CLERC, P.; DÉVÉHAT, F.L. The use of anisaldehyde sulfuric acid as an alternative spray reagent in TLC analysis reveals three classes of compounds in the genus *Usnea Adans.* (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). Preprints, 2018020151, 2018. doi: 10.20944/preprints201802.0151.v1
- GOMATHY, S.; RATHINAM, K.M.S. Identification of insecticidal compounds in *Terminalia arjuna* bark extract using gas chromatography and mass spectroscopic technique. International Journal of Entomology Research, 2(6):108-112, 2017.
- GOMES, J.H.S.; MBIAKOP, U.C.; OLIVEIRA, R.L.; STEHMANN, J.R.; PÁDUA, R.M.; CORTES, S.F.; BRAGA, F.C. Polyphenol-rich extract and fractions of *Terminalia phaeocarpa* Eichler possess hypoglycemic effect, reduce the release of cytokines, and inhibit lipase, α -glucosidase, and α -amilase enzymes. Journal of ethnopharmacology, 271:113847, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2021.113847
- GÓMEZ-CALDERÓN, C.; MESA-CASTRO, C.; ROBLEDO, S.; GÓMEZ, S.; BOLIVAR-AVILA, S.; DIAZ-CASTILLO, F.; MARTÍNEZ-GUTIERREZ, M. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on *Dengue* and *Chikungunya virus* infections. BMC complementary and alternative medicine, 17(1):57, 2017. doi: 10.1186/s12906-017-1562-1
- GONZÁLEZ, A.G.; FRAGA, B.M.; GONZÁLEZ, P.; MARTA, M.; MONACHE, F.D.; MARINI-BETTOLO, G.B.; MELLO, J.F.; GONCALVES, O. A revised structure for the triterpene rigidinol. Phytochemistry, 21(2)470-471, 1982. doi: 10.1016/S0031-9422(00)95296-8
- GOURINAT, A.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C.; DUPONT-ROUZEYROL, M. Detection of *Zika virus* in urine. Emerging Infectious Diseases, 21(1):84-6, 2015. doi: 10.3201/eid2101.140894
- GUIMARÃES, A.C.; SIANI, A.C. Triterpenes from the leaves of *Protium strumosum*. Revista Fitos, 3(1), 2007. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/18417/2/6.pdf>> acessado em: 02/04/2022.
- GUIMARÃES, K.G.; DE SOUZA FILHO, J.D.; DOS MARES-GUIA, T.R.; BRAGA, F.C. Dihydroisocoumarin from *Xyris pterygoblephara* active against dermatophyte fungi. Phytochemistry, 69(2)439-444, 2008. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.08.002
- GUTIÉRREZ-BUGALLO, G.; PIEDRA, L. A.; RODRIGUES, M.; BISSET, J. A.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; WEAVER, S. C.; VASILAKIS, N.; VEJA-RÚA, A. Vector-borne transmission and evolution of *Zika virus*. Nature Ecology & Evolution. Vol. 3(4):561-569, 2019. doi: 10.1038/s41559-019-0836-z
- GUZMAN, M.G.; HARRIS, E. Dengue. Lancet, 385(9966):453-65, 2015. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9
- HADDAD, J.G.; GRAUZYDYTĖ, D.; KOISHI, A.C.; VIRANAICKEN, W.; VENSKUTONIS, P.R.; SANTOS, C.N.D.; DESPRÈS, P.; DIOTEL, N.; EL KALAMOUNI, C. The geraniin-rich extract from Reunion Island endemic medicinal plant *Phyllanthus*

- phillyreifolius* inhibits *Zika* and *Dengue virus* infection at non-toxic effect doses in Zebrafish. *Molecules*, 25(10)2316, 2020. doi: 10.3390/molecules25102316
- HADDAD, J.G.; KOISHI, A.C.; GAUDRY, A.; DOS SANTOS, C.N.D.; VIRANAICKEN, W.; DESPRÈS, P.; EL KALAMOUNI, C. *Doratoxylon apetalum*, an indigenous medicinal plant from Mascarene Islands, is a potent inhibitor of *Zika* and *Dengue virus* infection in human cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10):2382, 2019a. doi:10.3390/ijms20102382
- HADDAD, J.G.; PICARD, M.; BÉNARD, S.; DESVIGNES, C.; DESPRÈS, P.; DIOTEL, N.; EL KALAMOUNI, C. *Ayapana triplinervis* essential oil and its main component thymohydroquinone dimethyl ether inhibit *Zika virus* at doses devoid of toxicity in Zebrafish. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(19)3447, 2019b. doi: 10.3390/molecules24193447
- HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLERTLOP, N.; PERERA-LECOIN, M.; SURASOMBATPATTANA, P.; TALIGNANI, L.; THOMAS, F.; CAO-LORMEAU, V.M.; CHOUMET, V.; BRIANT, L.; DESPRÈS, P.; AMARA, A.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Biology of *Zika virus* infection in human skin cells. *Journal of virology*, 89(17)8880-8896, 2015. doi: 10.1128/JVI.00354-15
- HASAN, S.S.; SEVVANA, M.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M.G. Structural biology of *Zika virus* and other *Flaviviruses*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(1):13-20, 2018. doi: 10.1038/s41594-017-0010-8
- HATTORI, M.; MA, C.M.; WEI, Y.; SALAH EL DINE, R.; SATO, N. Survey of anti-HIV and anti-HCV compounds from natural sources. *Canadian Chemical Transactions*, 1, 116-140, 2013. doi:10.13179/canchemtrans.2013.01.02.0017
- HILLS, S.L.; FISCHER, M.; PETERSEN, L.R. Epidemiology of *Zika virus* infection. *Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl_10):S868-S874, 2017. doi: 10.1093/infdis/jix434
- HO, Y-J.; LU, J-W.; HUANG, Y-L.; LAI, Z-Z. Palmatine inhibits *Zika virus* infection by disrupting virus binding, entry, and stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 518,732-738, 2019. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.120
- HU, Y.; CHEN, W.; SHEN, Y.; ZHU, B.; WANG, G.X. Synthesis and antiviral activity of coumarin derivatives against infectious hematopoietic necrosis virus. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 29(14)1749-1755, 2019. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.05.019
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. *Phytotherapy Research*, 13(1):31-36, 1999. doi:10.1002/(sici)1099-1573(199902)13:1<31::aid-ptr381>3.0.co;2-c
- IGLESIAS-CARRES, L.; MAS-CAPDEVILA, A.; BRAVO, F.I.; ARAGONÈS, G.; AROLA-ARNAL, A.; MUGUERZA, B. A comparative study on the bioavailability of phenolic compounds from organic and nonorganic red grapes. *Food chemistry*, 30(299):125092, 2019. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125092
- IOOS, S.; MALLET, H.P.; GOFFART, I.L.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. Current *Zika virus* epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(7):302-7, 2014. doi: 10.1016/j.medmal.2014.04.008
- JACKMAN, J.A.; COSTA, V.V.; PARK, S.; REAL, A.L.; PARK, J.H.; CARDOZO, P.L.; FERHAN, A.R.; OLMO, I.G.; MOREIRA, T.P.; BAMBIRRA, J.L.; QUEIROZ, V.F.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; FOUREAUX, G.; SOUZA, D.E.; RIBEIRO, F.M.; YOON, B.K.; WYNENDAELE, E.; SPIEGELEER, B.D.; TEIXEIRA, M.M.; CHO, N. Therapeutic treatment of *Zika virus* infection using a brain-penetrating antiviral peptide. *Nature Materials*, 17:971-977, 2018. doi: 10.1038/s41563-018-0194-2

- JACKMAN, J.A.; GOH, H.Z.; ZHDANOV, V.P.; KNOLL, W.; CHO, N.-J. Deciphering how pore formation causes strain-induced membrane lysis of lipid vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 138, 1406-1413, 2016. doi:10.1021/jacs.5b12491
- JONES, R.; KULKARNI, M.A.; DAVIDSON, T.M.V.; RADAM-LAC RESEARCH TEAM; TALBOT, B. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on *Zika*, *Dengue* and *Chikungunya virus* vectors. *PLoS One*, 15(2):e0220753, 2020. doi:10.1371/journal.pone.0220753
- JOSHI, U.P.; WAGH, R.D. GC-MS analysis of phytochemical compounds present in the stem bark extracts of plant *Maytenus emarginata*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 10(2):159, 2019. Disponível em: < [https://www.rjpbcs.com/pdf/2019_10\(2\)/\[24\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2019_10(2)/[24].pdf) > acessado em: 29/03/2022.
- KATZELNICK, L.C.; GRESH, L.; HALLORAN, M.E.; MERCADO, J.C.; KUANG, G.; GORDON, A.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 358(6365):929-932, 2017. doi: 10.1126/science.aan6836
- KESHARWANI, A.; POLACHIRA, S.K.; NAIR, R.; AGARWAL, A.; MISHRA, N.N.; GUPTA, S.K. Anti-HSV-2 activity of *Terminalia chebula* Retz extract and its constituents, chebulagic and chebulinic acids. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1):110, 2017. doi:10.1186/s12906-017-1620-8
- KIEM, P.V.; MINH, C.V.; HUONG, H.T.; NAM, N.H.; LEE, J.J.; KIM, Y.H. Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*. *Archives Pharmacol Research*, 27(11):1109-1113, 2004. doi: 10.1007/BF02975113
- KIM, T.G.; KANG, S.Y.; JUNG, K.K.; KANG, J.H.; LEE, E.; HAN, H.M.; KIM, S.H. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalia chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytotherapy research*, 15(8), 718-720, 2001. doi: 10.1002/ptr.832
- KNIFE, D. N.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013
- KOHN, L.K.; QUEIROGA, C.L.; MARTINI, M.C.; BARATA, L.E.; PORTO, P.S.; SOUZA, L.; ARNS, C.W. *In vitro* antiviral activity of Brazilian plants (*Maytenus ilicifolia* and *Aniba rosaeodora*) against bovine herpes virus type 5 and avian metapneumovirus. *Pharmaceutical biology*, 50(10), 1269-1275, 2012. doi: 10.3109/13880209.2012.673627
- KOLOKOLTSOV, A.A.; ADHIKARY, S.; GARVER, J.; JOHNSON, L.; DAVEY, R.A.; VELA, E. M. Inhibition of *Lassa virus* and *Ebola virus* infection in host cells treated with the kinase inhibitors genistein and tyrphostin. *Archives of virology*, 157(1):121-127, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1115-8>
- KOSTYUCHENKO, V.A.; LIM, E.X.; ZHANG, S.; FIBRIANSAH, G.; NG, T.S.; OOI, J.S.; SHI, J.; LOK, S.M. Structure of the thermally stable *Zika virus*. *Nature*, 533(7603):425-428, 2016. <https://doi.org/10.1038/nature17994>
- KOVGANKO, N.V.; KASHKAN, Z.N.; BORISOV, E.V.; BATURA, E.V. ¹³C NMR spectra of β -sitosterol derivatives with oxidized rings A and B. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(6):646-649, 1999. doi: 10.1007/BF02236293
- KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P.D. Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harb Protoc.*, 2018(6), 2018. doi: 10.1101/pdb.prot095497
- KURSCHEIDT, F.A.; MESQUITA, C.; DAMKE, G.; DAMKE, E.; CARVALHO, A.; SUEHIRO, T.T.; TEIXEIRA, J.; DA SILVA, V.; SOUZA, R.P.; CONSOLARO, M. Persistence and clinical relevance of *Zika virus* in the male genital tract. *Nature reviews. Urology*, 16(4):211-230, 2019. doi: 10.1038/s41585-019-0149-7

- LANTTO, T.A.; COLUCCI, M.; ZÁVADOVÁ, V.; HILTUNEN, R.; RAASMAJA, A. Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chemistry*, 117(3):405-411, 2009. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.018
- LAZEAR, H.M.; DIAMOND, M.S. *Zika virus*: New clinical syndromes and its emergence in the Western Hemisphere. *Journal of virology*, 90(10):4864-4875, 2016. doi: 10.1128/JVI.00252-16
- LEE, J.L.; LOE, M.W.C.; LEE, R.C.H.; CHU, J.J.H. Antiviral activity of pinocembrin against *Zika virus* replication. *Antiviral Research*, 167:13-24, 2019. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.04.003
- LEITE, J.P.V.; BRAGA, F.C.; ROMUSSI, G.; PERSOLI, R.M.; TABACH, R.; CARLINI, E.A.; OLIVEIRA, A.B. Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2):248-254, 2010. doi: 10.1590/S0103-50532010000200009
- LEMONS, M.; DE BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.; DA SILVA FILHO, A.A.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(4):603-608, 2007. doi: 10.1211/jpp.59.4.0017
- LI, C.; DENG, Y.Q.; WANG, S.; MA, F.; ALIYARI, R.; HUANG, X.Y.; ZHANG, N.N.; WATANABE, M.; DONG, H.L.; LIU, P.; LI, X.F.; YE, Q.; TIAN, M.; HONG, S.; FAN, J.; ZHAO, H.; LI, L.; VISHLAGHI, N.; BUTH, J. E.; AU, C.; LIU, Y.; LU, N.; DU, P.; QIN, F.X.; ZHANG, B.; GONG, D.; DAI, X.; SUN, R.; NOVITCH, B.G.; XU, Z.; QIN, C.; CHENG, G. 25-Hydroxycholesterol protects host against *Zika virus* infection and its associated microcephaly in a mouse model. *Immunity*, 46(3):446-456, 2017a. doi: 10.1016/j.immuni.2017.02.012
- LI, C.; ZHU, X.; JI, X.; QUANQUIN, N.; DENG, Y.Q.; TIAN, M.; ALIYARI, R.; ZUO, X.; YUAN, L.; AFRIDI, S.K.; LI, X.F.; JUNG, J.U.; NIELSEN-SAINES, K.; QIN, F.X.; QIN, C.F.; XU, Z.; CHENG, G. Chloroquine, a FDA-approved drug, prevents *Zika virus* infection and its associated congenital microcephaly in mice. *EBioMedicine*, 24:189–194, 2017b. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.09.034
- LI, G.; BOS, S.; TSETTSARKIN, K. A.; PLETNEV, A. G.; DESPRÈS, P.; GADEA, G.; ZHAO, R.Y. The Roles of prM-E Proteins in historical and epidemic *Zika virus*-mediated infection and neurocytotoxicity. *Viruses*, 11(2):157, 2019. doi: 10.3390/v11020157
- LIM, H.J.; NGUYEN, T.T.; KIM, N.M.; PARK, J.S.; JANG, T.S.; KIM, D. Inhibitory effect of flavonoids against NS2B-NS3 protease of *Zika virus* and their structure activity relationship. *Biotechnology letters*, 39(3), 415-421, 2017. doi: 10.1007/s10529-016-2261-6
- LOE, M.W.C.; HAO, E.; CHEN, M.; LI, C.; LEE, R.C.H.; ZHU, I.X.Y.; TEO, Z.Y.; CHIN, W.X.; HOU, X.; DENG, J.; CHU, J.J.H. Betulinic acid exhibits antiviral effects against *Dengue virus* infection. *Antiviral research*, 184:104954, 2020. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104954
- LOGAN, I.S. *Zika*-How fast does this virus mutate?. *Zoological Research* 37(2): 110-115, 2016. doi:10.13918/j.issn.2095-8137.2016.2.110
- LOWE, R.; BARCELLOS, C.; BRASIL, P.; CRUZ, O.G.; HONÓRIO, N.A.; KUPER, H.; CARVALHO, M.S. The *Zika virus* epidemic in Brazil: From discovery to future implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5(1):96, 2018. doi:10.3390/ijerph15010096
- LUPLERTLOP, N.; SUWANMANEE, S.; MUANGKAEW, W.; AMPAWONG, S.; KITISIN, T.; POOVORAWAN, Y. The impact of *Zika virus* infection on human neuroblastoma

- (SH-SY5Y) cell line. *Journal of vector borne diseases*, 54(3):207-214, 2017. doi: 10.4103/0972-9062.217611
- LYU, S.Y.; RHIM, J.Y.; PARK, W.B. Antitherpetic activities of flavonoids against *herpes simplex virus* type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. *Archives of pharmacal research*, 28(11):1293-1301, 2005. doi: 10.1007/BF02978215
- MA, W.; LI, S.; MA, S.; JIA, L.; ZHANG, F.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; WONG, G.; ZHANG, S.; LU, X.; LIU, M.; YAN, J.; LI, W.; QIN, C.; HAN, D.; QIN, C.; WANG, N.; LI, X.; GAO, G.F. *Zika virus* causes testis damage and leads to male infertility in mice. *Cell*, 167(6):1511–1524.e10, 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.016
- MACNAMARA, F. N. *Zika virus*: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(2):139-45, 1954. doi: 10.1016/0035-9203(54)90006-1
- MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6):1517-1575, 1994. doi:10.1016/s0031-9422(00)89569-2
- MALANÍK, M.; TREML, J.; RJAŠKOVÁ, V.; TÍŽKOVÁ, K.; KAUCKÁ, P.; KOKOŠKA, L.; KUBATKA, P.; ŠMEJKAL, K. *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.: phytochemistry and pharmacological activity. *Molecules*, 24(12):2288, 2019. doi: 10.3390/molecules24122288
- MANN, A.; KOLO IBRAHIM, K.; OYEWALE, A.O.; AMUPITAN, J.O.; FATOPE, M.O.; OKOGUN, J.I. Isolation and elucidation of three triterpenoids and its antimycobacterial activity of *Terminalia avicennioides*. *American Journal of Organic Chemistry*, 2(2):14-20, 2012. doi: 10.5923/j.ajoc.20120202.03
- MARQUES, A.M.; PROVANCE, D.W.JR.; KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R. *Echinodorus grandiflorus*: Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological overview of a medicinal plant used in Brazil. *Food and Chemical Toxicology*, 109(Pt 2):1032-1047, 2017. doi: 10.1016/j.fct.2017.03.026
- MARTINEZ, J.P.; SASSE, F.; BRÖNSTRUP, M.; DIEZ, J.; MEYERHANS, A. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Natural product reports*, 32(1):29-48, 2015. doi: 10.1039/c4np00085d
- MARTUCCIELLO S.; BALESTRIERI, M. L.; FELICE, F.; ESTEVAM, C.; SANT'ANA, A. E.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. Effects of triterpene derivatives from *Maytenus rigida* on VEGF-induced Kaposi's sarcoma cell proliferation. *Chem Biol Interact.* 183(3):450-454, 2010. doi: 10.1016/j.cbi.2009.12.012
- MASLOW, J.N. *Zika* vaccine development-current progress and challenges for the future. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(3):104, 2019. doi: 10.3390/tropicalmed4030104
- MASMEJAN, S.; BAUD, D.; MUSSO, D.; PANCHAUD, A. *Zika virus*, vaccines and antiviral strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(6):471-483, 2018. doi: 10.1080/14787210.2018.1483239
- MESQUITA, A.A.L.; CORRÊA, D.B.; PÁDUA, A.P.; GUEDES, M.L.O.; GOTTLIEB, O.R. Flavonoids from four compositae species. *Phytochemistry*, 25(5):1255-1256, 1986. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81599-X
- MINER, J.J.; CAO, B.; GOVERO, J.; SMITH, A.M.; FERNANDEZ, E.; CABRERA, O.H.; GARBER, C.; NOLL, M.; KLEIN, R.S.; NOGUCHI, K. K.; MYSOREKAR, I.U.; DIAMOND, M.S. *Zika virus* infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*, 165(5):1081–1091, 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008
- MINER, J.J.; DIAMOND, M.S. *Zika virus* pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host & Microbe*, 21(2):134-142, 2017. doi:10.1016/j.chom.2017.01.004

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 16 de 2022. Bol. Epidemiol. 2022, 53, 1-16. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no16/view> > acessado em: 23/05/2022a.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 6, 2022. Bol. Epidemiol. 2022, 53, 1-21. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no06/view> > acessado em: 19/03/2022b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde - Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: situação epidemiológica, ações desenvolvidas e desafios de 2015 a 2019. Bol. Epidemiol. 2019, 1-31. Disponível em: < <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/05/be-sindrome-congenita-vfinal.pdf> > acessado em: 04/05/2020.
- MITROCOTSA, D.; MITAKU, S.; AXARLIS, S.; HARVALA, C.; MALAMAS, M. Evaluation of the antiviral activity of kaempferol and its glycosides against human cytomegalovirus. *Planta medica*, 66(4)377-379, 2000. doi: 10.1055/s-2000-8550
- MOHD, A.; ZAINAL, N.; TAN, K-K.; BAKAR, S.A. Resveratrol affects *Zika virus* replication *in vitro*. *Scientific reports*, 9, 14336, 2019. doi: s41598-019-50674-3
- MONTANHA, A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S.A.L.; SCHENKEL, L.P.; ROEHE, P.M. Antiviral activity of brazilian plant extracts *Jarbas*. *Acta Farm. Bonaerense* 23(2)183-6, 2004. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/labvir/artigos/artigo48.pdf> > acessado em: 14/06/2020.
- MONTANHA, J.A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S.A.L.; SCHENKEL, E.P.; ROEHE, P.M. Antiviral activity of brazilian plant extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2): 183-6 (2004). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6637>
- MOORE, C.A.; STAPLES, J.E.; DOBYNS, W.B.; PESSOA, A.; VENTURA, C.V.; FONSECA, E.B.; RIBEIRO, E.M.; VENTURA, L.O.; NETO, N.N.; ARENA, J.F.; RASMUSSEN, S.A. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. *JAMA Pediatrics*, 171(3):288-295, 2017. doi: 10.1001/jamapediatrics.2016.3982
- MOSER LA, BOYLAN, B.T.; MOREIRA, F.R.; MYERS, L.J.; SVENSON, E.L.; FEDOROVA, N.B.; PICKETT, B.E.; BERNARD, K.A. Growth and adaptation of *Zika virus* in mammalian and mosquito cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(11):e0006880, 2018. doi: 10.1371/journal.pntd.0006880
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- MOSSI, A.J.; MAZUTTI, M.A.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; DALLAGO, R.; LEONTIEV-ORLOV, O.; TREICHEL, H.; ECHEVERRIGARAY, S.; FILHO, I.N. Variabilidade química de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis de populações nativas de *Maytenus ilicifolia*. *Química Nova*, 33(5)1067-1070, 2010. doi: 10.1590/S0100-40422010000500011
- MOUNCE, B.C.; CESARO, T.; CARRAU, L.; VALLET, T.; VIGNUZZI, M. Curcumin inhibits *Zika* and *Chikungunya virus* infection by inhibiting cell binding. *Antiviral research*, 142, 148-157, 2017. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.03.014
- MURAYAMA, T.; EIZURU, Y.; YAMADA, R.; SADANARI, H.; MATSUBARA, K.; RUKUNG, G.; TOLO, F.M.; MUNGAI, G.M.; KOFI-TSEKPO, M.

- Anticytomegalovirus activity of pristimerin, a triterpenoid quinone methide isolated from *Maytenus heterophylla* (Eckl. & Zeyh.). *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 18(3), 133–139, 2007. doi: 10.1177/095632020701800303
- MUSSO, D.; GUBLER, D.J. *Zika virus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3):487-524, 2016. doi: 10.1128/CMR.00072-15
- MUSSO, D.; KO, A.I.; BAUD, D. *Zika virus* infection - after the pandemic. *New England Journal of Medicine*, 381(15):1444-1457, 2019. doi: 10.1056/NEJMra1808246
- MUSSO, D.; NILLES, E.J.; CAO-LORMEAU, V.M. Rapid spread of emerging *Zika virus* in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10):O595-6, 2014. doi: 10.1111/1469-0691.12707
- MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.M. Potential sexual transmission of *Zika virus*. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2):359-61, 2015. doi: 10.3201/eid2102.141363
- NASCIMENTO, C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters*, 5(2)401-406, 2012. doi: 10.1016/j.phytol.2012.03.013
- NASCIMENTO, L.A.S.; GUILHON, G.M.S.P.; ARRUDA, M.S.P.; SANTOS, L.S.; ARRUDA, A.C.; MÜLLER, A.H.; SILVA, M.N.; RODRIGUES, S.T.; CARVALHO, M.G. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl. Ochnaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4)823-827, 2009. doi: 10.1590/S0102-695X2009000600004
- NEUFELDT, C.J.; CORTESE, M.; ACOSTA, E.C.; BARTENSCHLAGER, R. Rewiring cellular networks by members of the *Flaviviridae* family. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3):125-142, 2018. doi: 10.1038/nrmicro.2017.170
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Produtos Naturais como fontes de novas drogas nas quase quatro décadas de 01/1981 a 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3)770-803, 2020. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285
- NIELSEN-SAINES, K.; BRASIL, P.; KERIN, T.; VASCONCELOS, Z.; GABAGLIA, C.R.; DAMASCENO, L.; PONE, M.; CARVALHO, L.M.A.; PONE, S.M.; ZIN, A.A.; TSUI, I.; SALLES, T.R.S.; CUNHA, D.C.; COSTA, R.P.; MALACARNE, J.; REIS, A.B.; HASUE, R.H.; AIZAWA, C.Y.P.; GENOVESI, F.F.; EINSPIELER, C.; MARSCHIK, P.B.; PEREIRA, J.P.; GAW, S.L. et al. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. *Nature medicine*, 25;1213-1217, 2019. doi:10.1038/s41591-019-0496-1
- NIERO, R.; DE ANDRADE, S.F.; CECHINEL FILHO, V. A review of the ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of plants of the *Maytenus* genus. *Current pharmaceutical design*, 17(18):1851-71, 2011. doi: 10.2174/138161211796391029
- NOWAKOWSKI, T.J.; POLLEN, A.A.; DI LULLO, E.; SANDOVAL-ESPINOSA, C.; BERSHTEYN, M.; KRIEGSTEIN, A.R. Expression analysis highlights AXL as a candidate *Zika virus* entry receptor in neural stem cells. *Cell stem cell*, 18(5)591-596, 2016. doi: 10.1016/j.stem.2016.03.012
- OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFAR, I.; LASTÈRE, S.; VALOUR, F.; BAUDOIN, L.; MALLET, H.P.; MUSSO, D.; GHAWCHE, F. *Zika virus* infection complicated by Guillain-Barré syndrome-case report, French Polynesia, 2013. *Euro Surveill*, 19(9):20720, 2014. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720
- OGBOLE, O.O.; AKINLEYE, T.E.; SEGUN, P.A.; FALEYE, T.C.; ADENIJI, A.J. *In vitro* antiviral activity of twenty-seven medicinal plant extracts from Southwest Nigeria against

- three serotypes of echoviruses. *Virology Journal*, 15:110, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1022-7>
- OJHA, C.R.; RODRIGUEZ, M.; LAPIERRE, J.; KARUPPAN, M.K.M.; BRANSCOME, H.; KASHANCHI, F.; EL-HAGE, N. Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of *Zika virus*. *Frontiers in Immunology*, 9:2340, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02340
- OLIVEIRA MELO, A.S.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P.O.; SAMPAIO, S.A.; FILIPPIS, A.M.B. *Zika virus* intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(1):6-7, 2016. doi: 10.1002/uog.15831
- OLIVEIRA, M.B.S.; VALENTIM, I. B.; DOS SANTOS ROCHA, T.; SANTOS, J. C.; NOBRE PIRES, K. S.; LIRA TANABE, E.L.; CRUZ BORBELY, K.S.; BORBELY, A.U.; FONSECA GOULART, M.O. *Schinus terebenthifolius* Raddi extracts: from sunscreen activity toward protection of the placenta to *Zika virus* infection, new uses for a well-known medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 152:112503, 2020. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112503
- OLIVEIRA, S.L.; SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; SENA-FILHO, J.G.; LUCENA, H.F.S.; ROMERO, M.A.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Tropane alkaloids from *Erythroxylum* genus: Distribution and compilation of ¹³C-NMR spectral data. *Chemistry & Biodiversity*, 7(2), 302-326, 2010. doi: 10.1002/cbdv.200800290
- OLMO, I.G.; CARVALHO, T.G.; COSTA, V.V.; ALVES-SILVA, J.; FERRARI, C.Z.; IZIDORO-TOLEDO, T.C.; DA SILVA, J.F.; TEIXEIRA, A.L.; SOUZA, D.G.; MARQUES, J.T.; TEIXEIRA, M.M.; VIEIRA, L.B.; RIBEIRO, F.M. *Zika virus* promotes neuronal cell death in a non-cell autonomous manner by triggering the release of neurotoxic factors. *Frontiers in immunology*, 8, 1016, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01016
- PAHO/WHO. Epidemiological Alert: Neurological syndrome, congenital malformations, and *Zika virus* infection. Implications for public health in the Américas, p.1-8, 2015. Disponível: <<https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome%2520%282%29.pdf>> acessado em: 04/05/2020.
- PEREIRA, G.A.; ARRUDA, H.S.; DE MORAIS, D.R.; PEIXOTO ARAUJO, N.M.; PASTORE, G.M. Mutamba (*Guazuma ulmifolia* Lam.) fruit as a novel source of dietary fibre and phenolic compounds. *Food chemistry*, 310:125857, 2020. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125857
- PESSOA, A.; LINDEN, V.V.D.; YEARGIN-ALLSOPP, M.; CARVALHO, M.D.CG.; RIBEIRO, E.M.; BRAUN, K.V.N.; DURKIN, M.S.; PASTULA, D.M.; MOORE, J.T.; MOORE, C.A. Motor abnormalities and epilepsy in infants and children with evidence of congenital *Zika virus* infection. *Pediatrics*, 141(Suppl 2):S167-S179, 2018. doi: 10.1542/peds.2017-2038F
- PETERSEN, L.R.; JAMIESON, D.J.; POWERS, A.M.; HONEIN, M.A. *Zika virus*. *The New England journal of medicine*, 374(16):1552-1563, 2016. doi: 10.1056/NEJMra1602113
- PITTS, J.D.; LI, P.C.; DE WISPELAERE, M.; YANG, P.L. Antiviral activity of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) against *Zika virus*. *Antiviral Research*, 147, 124-130, 2017. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.10.014
- POKIDYSHEVA, E.; ZHANG, Y.; BATTISTI, A.J.; BATOR-KELLY, C. M.; CHIPMAN, P.R.; XIAO, C.; GREGORIO, G.G.; HENDRICKSON, W.A.; KUHN, R.J.; ROSSMANN, M. G. Cryo-EM reconstruction of *Dengue virus* in complex with the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. *Cell*, 124(3):485-493, 2006. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.042

- PRAKASH, A.; VARMA, R. K.; GHOSAL, S. Alkaloidal constituents of *Sida acuta*, *S. humilis*, *S. rhombifolia* and *S. spinose*. *Planta Medica*, 43(4):384-8, 1981. doi: 10.1055/s-2007-971529
- QUEIROGA, C.L.; SILVA, G.F.; DIAS, P.C.; POSSENTI, A.; DE CARVALHO, J.E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 72(3):465-468, 2000. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00237-3
- QUINTANA, V.M.; SELISKO, B.; BRUNETTI, J.E.; EYDOUX, C.; GUILLEMOT, J.C.; CANARD, B.; DAMONTE, E.B.; JULANDER, J.G.; CASTILLA, V. Antiviral activity of the natural alkaloid anisomycin against dengue and Zika viruses. *Antiviral Research*, 176, 104749, 2020. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104749
- RABELO, A. C. S.; COSTA, D. C. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. *Chemico-Biological Interactions*, 296:65-75, 2018. doi: 10.1016/j.cbi.2018.09.002
- RAHALISON, L.; BENATHAN, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P. N.; FUZZATI, N.; HOSTETTMANN, K. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. *Planta Medica*, 61(4):360-362, 1995. doi: 10.1055/s-2006-958101
- RAO, G.S.; SINSHEIMER, J.E. Antiviral activity of triterpenoid saponins containing acylated beta-amyrin aglycones. *Journal of pharmaceutical sciences*, 63(3):471-3, 1974. doi: 10.1002/jps.2600630341
- RASMUSSEN, S.A.; JAMIESON, D.J.; HONEIN, M.A.; PETERSEN, L.R. *Zika virus* and birth defects - reviewing the evidence for causality. *The New England journal of medicine*, 374(20):1981-1987, 2016. doi: 10.1056/NEJMs1604338
- RAUSCH, K.; HACKETT, B. A.; WEINBREN, N. L.; REEDER, S. M.; SADOVSKY, Y.; HUNTER, C. A.; SCHULTZ, D. C.; COYNE, C. B.; CHERRY, S. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against *Zika virus*. *Cell Reports*, 18(3):804-815, 2017. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.068
- REVVU, O.; ZEPEDA-VELAZQUEZ, C.; NIELSEN, A.J.; MCNULTY, J.; YOLKEN, R.H.; JONES-BRANDO, L. Total Synthesis of the Natural Product (+)-trans-Dihydronarciclasine via an Asymmetric Organocatalytic [3+3]-Cycloaddition and discovery of its potent anti-*Zika virus* (ZIKV) activity. *Chemistry Select*, (1)5895-5899, 2016. doi:10.1002/slct.201601536
- RIBEIRO, B.N.F.; MUNIZ, B.C.; GASPARETTO, E.L.; VENTURA, N.; MARCHIORI, E. Síndrome congênita pelo vírus Zika e achados de neuroimagem: o que sabemos até o momento?. *Radiologia Brasileira*, 50(5):314-322, 2017. doi: 10.1590/0100-3984.2017.0098
- ROBBIANI, D.F.; BOZZACCO, L.; KEEFFE, J.R.; KHOURI, R.; OLSEN, P.C.; GAZUMYAN, A.; SCHAEFER-BABAJEW, D.; AVILA-RIOS, S.; NOGUEIRA, L.; PATEL, R.; AZZOPARDI, S.A.; UHL, L.; SAEED, M.; SEVILLA-REYES, E.E.; AGUDELO, M.; YAO, K.H.; GOLJANIN, J.; GRISTICK, H.B.; LEE, Y.E.; HURLEY, A.; CASCEY, M.; PAI, J.; OLIVEIRA, T.; JR WUNDER, E.A.; SACRAMENTO, G.; JR NERY, N.; ORGE, C.; COSTA, F.; REIS, M.G.; THOMAS, N.M.; EISENREICH, T.; WEINBERGER, D.M.; ALMEIRA, A.R.P.; JR WEST, A.P.; RICE, C.M.; BJORKMAN, P.J.; REYES-TERAN, G.; KO, A.I.; MACDONALD, M.R.; NUSSENZWEIG, M.C. Recurrent potent human neutralizing antibodies to *Zika virus* in Brazil and Mexico. *Cell*, 169(4):597-609.e11, 2017. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.024
- ROCHA MB, SOUZA, F.V.; DOS SANTOS, E.C.; PIZZA C.; SANT'ANA, A.E.; MARÇAL, R.M. Antispasmodic effect of 4'-methylepigallocatechin on guinea pig ileum. *Fitoterapia*. 83(7):1286-1290, 2012. doi:10.1016/j.fitote.2012.05.010

- ROCHA, M.P.; CAMPANA, P.R.V.; PÁDUA, R.M.; FILHO, J.D.S.; FERREIRA, D.; BRAGA, F.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*, 2020. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c00074
- RODRIGUES, C.M.; BRITO, A.R.M.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; VILEGAS, W. Constituintes químicos das cascas de *Hancornia speciosa* Gom. (Apocynaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Resumos. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/29ra/resumos/T1814-2.pdf>> acessado em: 29/04/2020.
- ROMBI, F.; BAYLISS, R.; TUPLIN, A.; YEOH, S. The journey of Zika to the developing brain. *Molecular Biology Reports*, 47(4):3097-3115, 2020. doi: 10.1007/s11033-020-05349-y
- ROY A.; LIM, L.; SONG, J. Identification of quercetin from fruits to immediately fight Zika. *bioRxiv*, 2018. doi: 10.1101/074559
- ROY, A.; LIM, L.; SRIVASTAVA,S.; LU, Y.; SONG, J. Solution conformations of Zika NS2B-NS3pro and its inhibition by natural products from edible plants. *PLoS ONE*, 12(7):e0180632, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0180632
- SABINO, C.; BASIC, M.; BENDER, D.; ELGNER, F.; HIMMELSBACH, K.; HILDT, E. Bafilomycin A1 and U18666A efficiently impair ZIKV infection. *Viruses*, 11(6)524, 2019. doi: 10.3390/v11060524
- SALAZAR, G.C.M.; SILVA, G.D.F.; DUARTE, L.P.; VIEIRA FILHO, S.A.; LULA, I.S. Two epimeric friedelane triterpenes isolated from *Maytenus truncata* Reiss: ¹H and ¹³C chemical shift assignments. *Magn. Reson. Chem.*, 38: 977–980, 2000. doi: 10.1002/1097-458X(200011)38:11<977::AID-MRC757>3.0.CO;2-9
- SANTOS, E.A.; SAMPAIO, T.S.; FEITOSA, J.G.R.; RIBEIRO, A.O.; NOGUEIRA, P.C.L. Constituintes voláteis das folhas de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). In Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Resumos. São Paulo, 2006. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/29ra/resumos/T0056-1.pdf>> acessado em: 30/04/2020.
- SANTOS, R.F.; ISOBE, M.T.C.; LALLA, J.G.; HABER, L.L.; MARQUES, M.O.M.; MING, L.C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14:224-234, 2012. doi: 10.1590/S1516-05722012000500017
- SANTOS, V.A.; LEITE, K.M.; DA COSTA SIQUEIRA, M.; REGASINI, L.O.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C. T.; GALUPPO, M. K.; STOLF, B. S.; PEREIRA, A. M.; CICARELLI, R. M.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M.A. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules*, 18(1):1053-1062, 2013. doi: 10.3390/molecules18011053
- SCHULER-FACCINI, L.; RIBEIRO, E.M.; FEITOSA, I.M.; HOROVITZ, D.D.; CAVALCANTI, D.P.; PESSOA, A.; DORIQUEI, M.J.R.; NERI, J.I.; NETO, J.M.P.; WANDERLEY, H.Y.C.; CERNACH, M.; EL-HUSNY, A.S.; PONE, M.V.S.; SERAO, C.L.C.; SANSEVERINO, M.T.V. Possible association between *Zika virus* infection and microcephaly - Brazil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 65(3):59-62, 2016. doi: 10.15585/mmwr.mm6503e2
- SEO, S.; TOMITA, Y.; TORI, K. Carbon-13 NMR spectra of urs-12-enes and application to structural assignments of components of tissue cultures. *Tetrahedron Letters*, 16(1):7-10, 1975. doi: 10.1016/s0040-4039(00)71763-1
- SHAPIRO-MENDOZA, C.K.; RICE, M.E.; GALANG, R.R.; FULTON, A.C.; VANMALDEGHEM, K.; PRADO, M.V.; ELLIS, E.; ANESI, M.S.; SIMEONE, R.M.; PETERSEN, E.E.; ELLINGTON, S.R.; JONES, A.M.; WILLIAMS, T.; REAGAN-

- STEINER, S.; PEREZ-PADILLA, J.; DESEDA, C.C.; BERON, A.; TUFA, A.J.; ROSINGER, A.; ROTH, N.M.; GREEN, C.; MARTIN, S.; LOPEZ, C.D.; WILDE, L.; GOODWIN, M.; PAGANO, P.; MAI, C.T.; GOULD, C.; ZAKI, S.; FERRER, L.N.; DAVIS, M.S.; LATHROP, E.; POLEN, K.; CRAGAN, J.D.; REYNOLDS, M.; NEWSOME, K.B.; HUERTAS, M.M.; BHATANGAR, J.; QUIÑONES, A.M.; NAHABEDIAN, J.F.; ADAMS, L.; SHARP, T.M.; HANCOCK, W.T.; RASMUSSEN, S.A.; MOORE, C.A.; JAMIESON, D.J.; MUNOZ-JORDAN, J.L.; GARSTANG, H.; KAMBUI, A.; MASAO, C.; HONEIN, M.A.; MEANEY-DELMAN, D. Zika pregnancy and Infant Registries Working Group (2017). Pregnancy outcomes after maternal *Zika virus* infection during pregnancy - U.S. Territories, January 1, 2016-April 25, 2017. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 66(23):615-621. doi: 10.15585/mmwr.mm6623e1
- SHARMA, N.; MURALI, A.; SINGH, S.K.; GIRI, R. Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the *Zika virus* entry into host cells via binding the envelope protein. International Journal of Biological Macromolecules, 104(Pt A), 1046-1054, 2017. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.105
- SHENG, Z.; YAN, X.; ZHANG, R.; NI, H.; CUI, Y.; GE, J.; SHAN, A. Assessment of the antidiarrhoeal properties of the aqueous extract and its soluble fractions of *Chebulae Fructus* (*Terminalia chebula* fruits). Pharmaceutical biology, 54(9):1847-56, 2016. doi: 10.3109/13880209.2015.1131993
- SHENG, Z.; ZHAO J.; MUHAMMAD, I.; ZHANG, Y. Optimization of total phenolic content from *Terminalia chebula* Retz. fruits using response surface methodology and evaluation of their antioxidant activities. PLoS One, 13(8):e0202368, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0202368
- SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. Journal of Natural Products, 57(12):1675-1681, 1994. doi:10.1021/np50114a009
- SILVA, F.C.; RODRIGUES, V.G.; DUARTE, L.P.; LULA, I.S.; SINISTERRA, R.D.; VIEIRA FILHO, S.A.; RODRIGUES, R.; KROON, E.G.; OLIVEIRA, P.L.; FARIAS, L.M.; MAGALHÃES, P.P.; SILVA, G. Antidiarrheal activity of extracts from *Maytenus gonoclada* and inhibition of *Dengue virus* by lupeol. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 89(3):1555-1564, 2017. doi: 10.1590/0001-3765201720160046
- SILVA, M.L.; STEHMANN, J.R.; SERAFIM, M.S.M.; VALE, V.V.; GONTIJO, D.C.; BRANDÃO, C.G.; KROON, E.G.; OLIVEIRA, A.B. *Himatanthus bracteatus* stem extracts present anti-*flavivirus* activity while an isolated sesquiterpene glucoside present only anti-*Zika virus* activity *in vitro*. Natural Product Research, 2019. doi: 10.1080/14786419.2019.1690487
- SILVEIRA, R.S.; LEAL, G.C.; MOLIN, T.R.D.; FACCIN, H.; GOBO, L.A.; SILVEIRA, G.D.; SOUZA, M.T.S.; LAMEIRA, O.A.; CARVALHO, L.M.; VIANA, C. Determination of phenolic and triterpenic compounds in *Jatropha gossypifolia* L by Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UHPLC-MS/MS)', Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 56, e17262, 2020. doi: 10.1590/s2175-97902019000417262
- SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; GOULD, E.A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESS, R.; SMITH, D.B.; STAPLETON, J.T. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*. Journal of General Virology, 98(1): 2-3, 2017. doi: 10.1099/jgv.0.000672
- SIMONI, I. C.; FELICIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; ROSSI, M. H. Avaliação da citotoxicidade de biflavonoides isolados de *Ourotea spectabilis* (*Ochnaceae*) em células de córnea de coelho SIRC. Arquivos do Instituto Biológico, 69(4):95-97, 2002. Disponível em:

- <http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/arq/V69_4/simoni.pdf >
 acessado em: 01/05/2020.
- SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, B.; SRIVASTAVA, M.; RAMESHKUMAR, K.B. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six *Terminalia* species by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with chemometric analysis. *Industrial Crops and Products*, 87, 236-246, 2016a. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.048
- SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; SHARMA, K.R.; KUMAR, B. Profiling of gallic and ellagic acid derivatives in different plant parts of *Terminalia arjuna* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *Natural Product Communications*, 11(2):1934578X1601100, 2016b. doi:10.1177/1934578x1601100227
- SINGH, P.; CHAKRABORTY, P.; HE, D.H.; MERGIA, A. Extract prepared from the leaves of *Ocimum basilicum* inhibits the entry of *Zika virus*. *Acta Virologica*, 63(3)316–321, 2019. doi: 10.4149/av_2019_307
- SIROHI, D.; CHEN, Z.; SUN, L.; KLOSE, T.; PIERSON, T.C.; ROSSMANN, M.G.; KUHN, R.J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of *Zika virus*. *Science*, 352(6284)467-470, 2016. doi: 10.1126/science.aaf5316
- SIROHI, D.; KUHN, R.J. *Zika virus* structure, maturation, and receptors. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(10)935-944 2017. doi: 10.1093/infdis/jix515
- SOBEH, M.; MAHMOUD, M.F.; HASAN, R.A.; ABDELFATTAH, M.A.O.; OSMAN, S.; RASHID, H.O.; EL-SHAZLY, A.M.; WINK, M. Chemical composition, antioxidant and hepatoprotective activities of methanol extracts from leaves of *Terminalia bellirica* and *Terminalia sericea* (Combretaceae). *PeerJ.*, 7:e6322, 2019. doi: 10.7717/peerj.6322
- Springer, 384 p. 1996.
- STETTLER, K.; BELTRAMELLO, M.; ESPINOSA, D. A.; GRAHAM, V.; CASSOTTA, A.; BIANCHI, S.; VANZETTA, F.; MINOLA, A.; JACONI, S.; MELE, F.; FOGLIERINI, M.; PEDOTTI, M.; SIMONELLI, L.; DOWALL, S.; ATKINSON, B.; PERCIVALLE, E.; SIMMONS, C.P.; VARANI, L.; BLUM, J.; BALDANTI, F.; CAMERONI, E.; HEWSON, R.; HARRIS, E.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; CORTI, D. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by *Zika virus* infection. *Science*, 353(6301)823-826, 2016. doi: 10.1126/science.aaf8505
- STROTTMANN, D. M.; ZANLUCA, C.; MOSIMANN, A.L.P.; KOISHI, A.C.; AUWERTER, N.C.; FAORO, H, CATANEO, A.H.D.; KUCZERA, D.; WOWK, P.F.; BORDIGNON, J.; DUARTE DOS SANTOS, C.N. Genetic and biological characterisation of *Zika virus* isolates from different Brazilian regions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 114, e190150, 2019. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190150>
- SUSIDARTI, R.A.; RAHMANI, M.; ALI, A.M.; SUKARI, M.A.; ISMAIL, H.B.M. Friedelin Dari Kelat Merah (*Eugenia chlorantha* Duthie). *J. Pharm. Sci.*, 31:1-8, 2007.
- SZE, A.; OLAGNIER, D.; HADJ, S.B.; HAN, X.; TIAN, X.H.; XU, H.T.; YANG, L.; SHI, Q.; WANG, P.; WAINBERG, M. A.; WU, J.H.; LIN, R. Sophoraflavenone G restricts *Dengue* and *Zika virus* infection via RNA polymerase interference. *Viruses*, 9(10)287, 2017. doi: 10.3390/v9100287
- TABATA, T.; PETITT, M.; PUERTA-GUARDO, H.; MICHELMAYR, D.; HARRIS, E.; PEREIRA, L. *Zika virus* replicates in proliferating cells in explants from first-trimester human placentas, potential sites for dissemination of infection. *J Infect Dis.*, 217(8):1202-1213, 2018. doi: 10.1093/infdis/jix552
- TANAKA, R.; IDA, T.; KITA, S.; KAMISAKO, W.; MATSUNAGA, S. A 3,4-seco-8βH-fernadienoic acid and other constituents from *Euphorbia chamaesyce*. *Phytochemistry*, 41, (4):1163-1168. 1996. doi: 10.1016/0031-9422(95)00721-0

- TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, S.C.; WEN, Z.; QIAN, X.; LI, Y.; YAO, B.; SHIN, J.; ZHANG, F.; LEE, E.M.; CHRISTIAN, K.M.; DIDIER, R.A.; JIN, P.; SONG, H.; MING, G.L. *Zika virus* infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell stem cell*, 18(5):587-590, 2016b. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016
- TANG, W.W.; YOUNG, M.P.; MAMIDI, A.; REGLA-NAVA, J.A.; KIM, K.; SHRESTA, S. A mouse model of *Zika virus* sexual transmission and vaginal viral replication. *Cell reports*, 17(12):3091-3098, 2016a. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.070
- TOUJANI, M.M.; RITTÀ, M.; CIVRA, A.; GENOVESE, S.; EPIFANO, F.; GHRAM, A.; LEMBO, D.; DONALISIO, M. Inhibition of HSV-2 infection by pure compounds from *Thymus capitatus* extract *in vitro*. *Phytotherapy research*, 32(8):1555-1563, 2018. doi: 10.1002/ptr.6084
- VÁZQUEZ-CALVO, Á.; OYA, N.J.; MARTÍN-ACEBES, M.A.; GARCIA-MORUNO, E.; SAIZ, J. Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the *Flaviviruses West Nile virus, Zika virus, and Dengue virus*. *Frontiers Microbiology*, 8: 1314, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01314
- VENTURA, C.V.; MAIA, M.; BRAVO-FILHO, V.; GÓIS, A.L.; BELFORT, R. *Zika virus* in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *Lancet*, 387(10015):228, 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00006-4
- VENTURI, C.R.; BORDIGNON, S.; ROEHE, P.M.; MONTANHA, J.A.; CIBULSKI, S. P.; GOSMANN, G. Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala*. *Natural product research*, 32(16):1960-1962, 2018. doi: 10.1080/14786419.2017.1354186
- VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim. Nova* 2005, 28, 85-94. doi: 10.1590/S0100-40422005000100017
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1,1112-1116, 2006. doi: 10.1038/nprot.2006.179
- VINCENT, A.A.; BARTHELEMY, K.A.; FEACUTE LIX, Z.T.; KOUAMEACUTE, M.A.; COULIBALI, S.; LEACUTE ON, A.D. Separation and characterization of phenolic compounds from *Terminalia ivoiriensis* using liquid chromatography positive electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *African Journal of Biotechnology*, 12(27):4393-4398, 2013. doi:10.5897/ajb12.2913
- VISTA, F.E.S.; DALMACIO, L.M.M.; CORALES, L.G.M.; SALEM, G.M.; GALULA, J.U.; CHAO, D-Y. Antiviral effect of crude aqueous extracts from ten Philippine medicinal plants against *Zika virus*. *Acta Medica Philippina*, 54(2):195-202, 2020. Disponível em: < <https://actamedicaphilippina.upm.edu.ph/index.php/acta/article/view/1501/1243> > acessado em: 13/06/2020.
- VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, 110:39-48, 2005. doi: 10.1385/1-59259-869-2:039
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin:
- WANG, G.K.; LIN, B.B.; RAO, R.; ZHU, K.; QIN, X.Y.; XIE, G.Y.; QIN, M.J. A new lignan with anti-HBV activity from the roots of *Bombax ceiba*. *Natural product research*, 27(15):1348-1352, 2013. doi: 10.1080/14786419.2012.740032
- WANG, T.; TOWN, T.; ALEXOPOULOU, L.; ANDERSON, J.F.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R.A. Tolllike receptor 3 mediates *West Nile virus* entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nature Medicine*, 12(10):1366-73, 2004. doi: 10.1038/nm1140
- WEIMANN, C.; GORANSSON, U.; PONGPRAYOON-CLAESON, U.; CLAESON, P.; BOHLIN, L.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(1):99-104, 2002. doi: 10.1211/0022357021771797

- WICHIT, S.; GUMPANGSETH, N.; HAMEL, R.; YAINOY, S.; ARIKIT, S.; PUNSAWAD, C.; MISSÉ, D. Chikungunya and Zika viruses: Co-circulation and the interplay between viral proteins and host factors. *Pathogens*, 10(4):448, 2021. doi: 10.3390/pathogens10040448
- WILLISON, H.J.; JACOBS, B.C.; VAN DOORN, P.A. (2016). Guillain-Barré syndrome. *Lancet*, 388(10045)717-727, 2016. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)
- WONG, G.; HE, S.; SIRAGAM, V.; BI, Y.; MBIKAY, M.; CHRETIEN, M.; QIU, X. Antiviral activity of quercetin-3- β -O-*D*-glucoside against *Zika virus* infection. *Virologica Sinica*, 32(6)545-547, 2017. doi: 10.1007/s12250-017-4057-9
- XIA, H.; LUO, H.; SHAN, C.; MURUATO, A.E.; NUNES, B.T.D.; MEDEIROS, D.B.A.; ZOU, J.; XIE, X.; GIRALDO, M.I.; VASCONCELOS, P.F.C.; WEAVER, S.C.; WANG, T.; RAJSBAUM, R.; SHI, P. An evolutionary NS1 mutation enhances *Zika virus* evasion of host interferon induction. *Nature Communications*, 9(1):414, 2018. doi: 10.1038/s41467-017-02816-2
- YLIOPISTO H. Antivirals that block influenza can also inhibit *Zika virus* infection, study shows. University of Helsinki, 2017. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/news/20170116/Antivirals-that-block-influenza-can-also-inhibit-Zika-virus-infection-study-shows.aspx>> acessado em:04/05/2020.
- YUAN, L.; HUANG, X.Y.; LIU, Z.Y.; ZHANG, F.; ZHU, X.L.; YU, J.Y.; JI, X.; XU, Y.P.; LI, G.; LI, C.; WANG, H.J.; DENG, Y.Q.; WU, M.; CHENG, M.L.; YE, Q.; XIE, D.Y.; LI, X. F.; WANG, X.; SHI, W.; HU, B.; SHI, P.-Y.; XU, Z.; QIN, C-F. A single mutation in the prM protein of *Zika virus* contributes to fetal microcephaly. *Science*, 358(6365):933-936, 2017. doi: 10.1126/science.aam7120
- YUAN, S.; CHAN, J.F.W.; DEN-HAAN, H.; CHIK, K.K.H.; ZHANG, A.J.; CHAN, C.C.S.; POON, V.K.M.; YIP, C.C.Y.; MAK, W.W.N.; ZHU, Z.; ZOU, Z.; TEE, K.M.; CAI, J.P.; CHAN, K.H.; DE LA PEÑA, J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; CERÓN-CARRASCO, J.P.; YUEN, K.Y. Structure-based discovery of clinically approved drugs as *Zika virus* NS2B-NS3 protease inhibitors that potently inhibit *Zika virus* infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Research*, 145, 33-43, 2017b. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.07.007
- ZANLUCA, C.; MELO, V.C.A.; MOSIMANN, A.L.P.; SANTOS, G.I.V.; SANTOS, C.N.D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of *Zika virus* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 110(4)569-572, 2015. doi: 10.1590/0074-02760150192
- ZHANG, D.; ZHAO, J.; WANG, X.; ZHAO, L.; LIU, H.; WEI, Y.; YOU, X.; CEN, S.; YU, L. Peniazaphilin A, a new azaphilone derivative produced by *Penicillium* sp. CPCC 400786. *The Journal of antibiotics*, 71(10)905-907, 2018. doi: 10.1038/s41429-018-0077-4
- ZHANG, L.; JI, M-Y.; QIU B, LI, Q-Y.; ZHANG, K-Y.; LIU, J-C.; DANG, L-S.; LI, M-H. Phytochemicals and biological activities of species from the genus *Maytenus*. *Med. Chem. Res.*, 29, 575-606, 2020. doi: 10.1007/s00044-020-02509-4
- ZHANG, X.; GE, P.; YU, X.; BRANNAN, J.M.; BI, G.; ZHANG, Q.; SCHEIN, S.; ZHOU, Z.H. Cryo-EM structure of the mature *Dengue virus* at 3.5-Å resolution. *Nature structural & molecular biology*, 20(1)105-110, 2013. doi: 10.1038/nsmb.2463
- ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y. *Flaviviridae* viruses and oxidative stress: Implications for viral pathogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019:1409582, 2019. doi: 10.1155/2019/1409582
- ZUANAZZI, J.A.; TREMEA, V.; LIMBERGER, R.P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A.T. Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(8):819-825, 2001. doi:10.1016/s0305-1978(01)00022-9

APÊNDICE A – ESPECTROS DE FRAGMENTAÇÃO

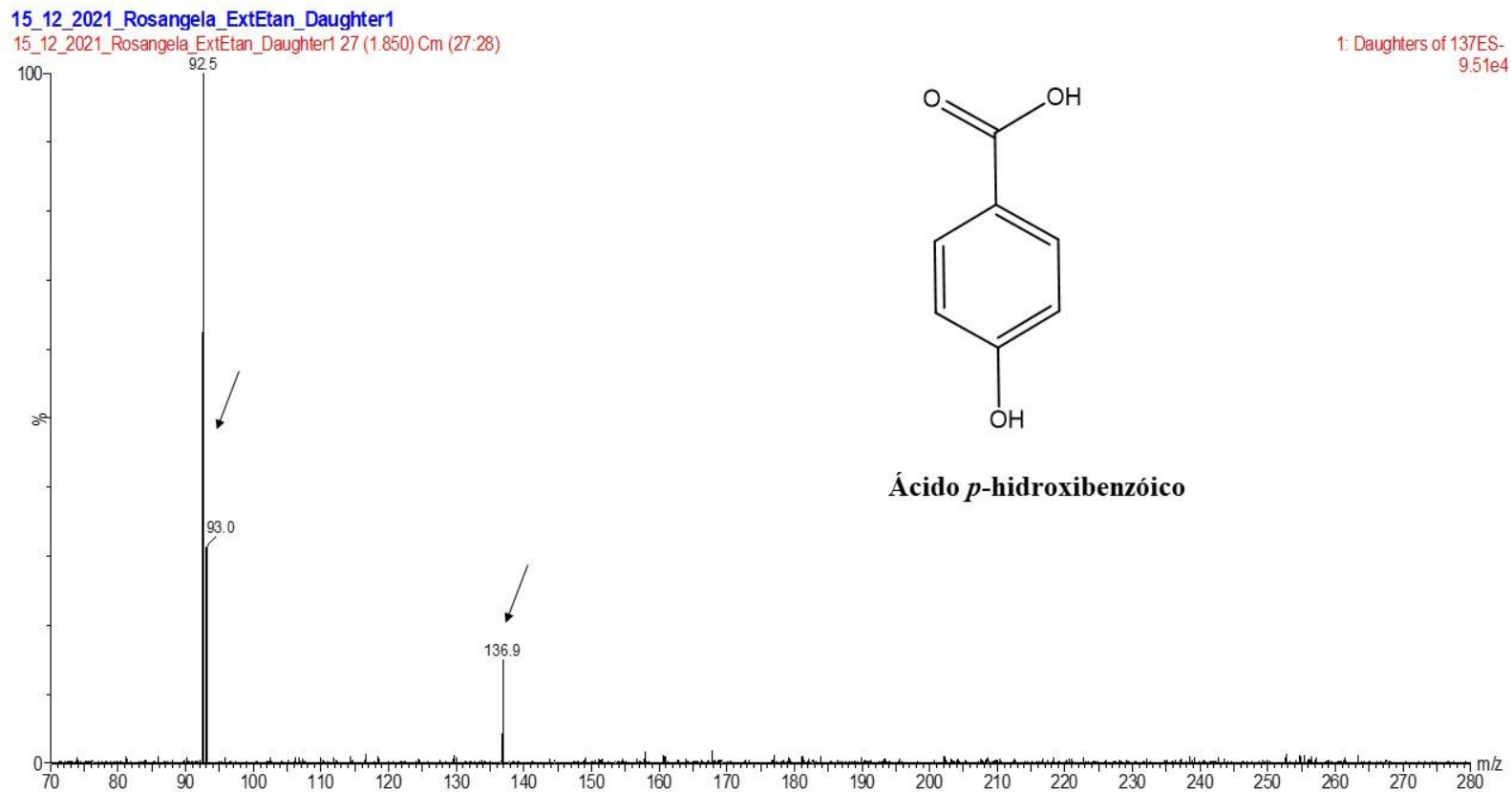


Figura 68. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 137 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido *p*-hidroxibenzóico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

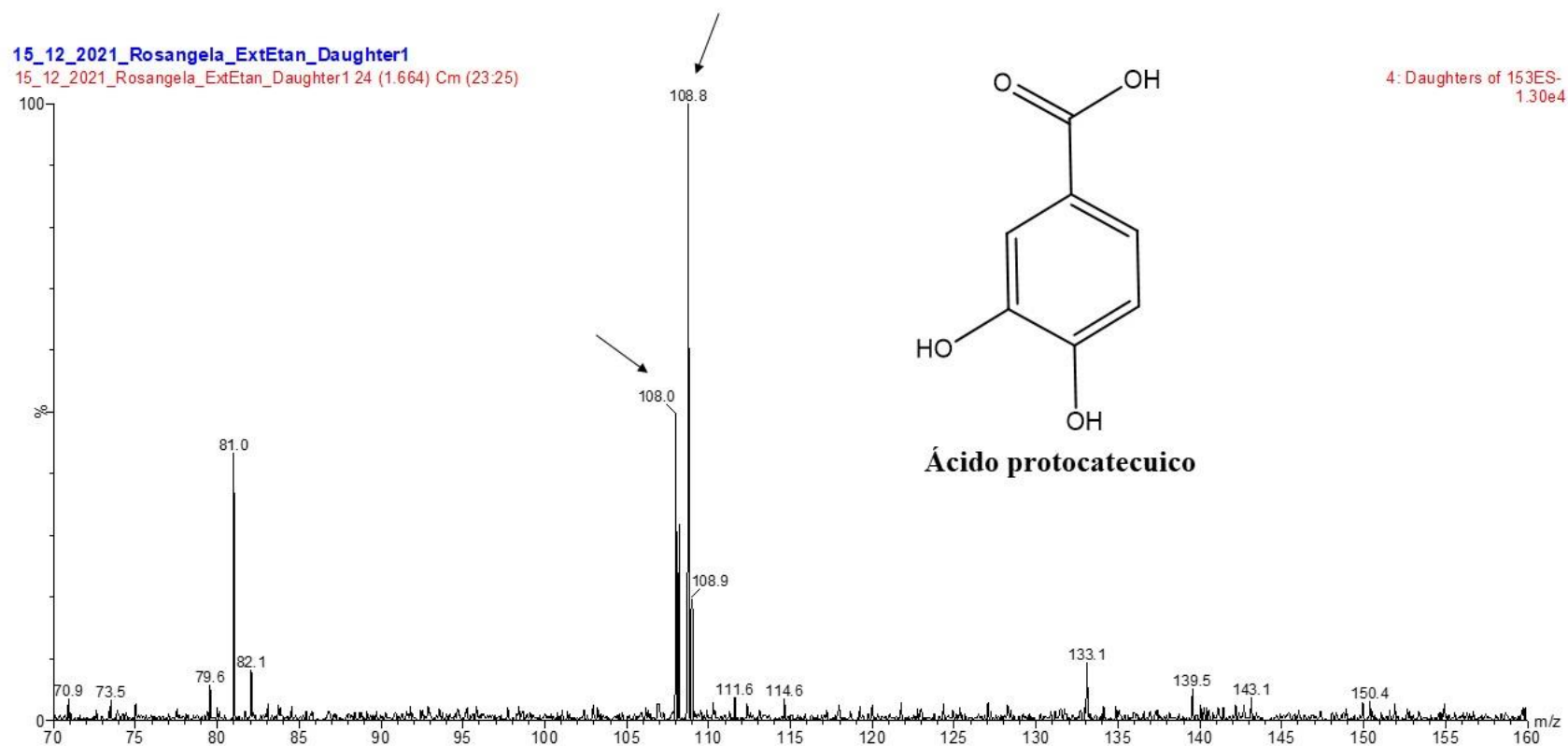


Figura 69. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 153 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido protocatecuico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter1
15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter1 24 (1.655) Cm (23:27)

3: Daughters of 153ES-
6.20e4

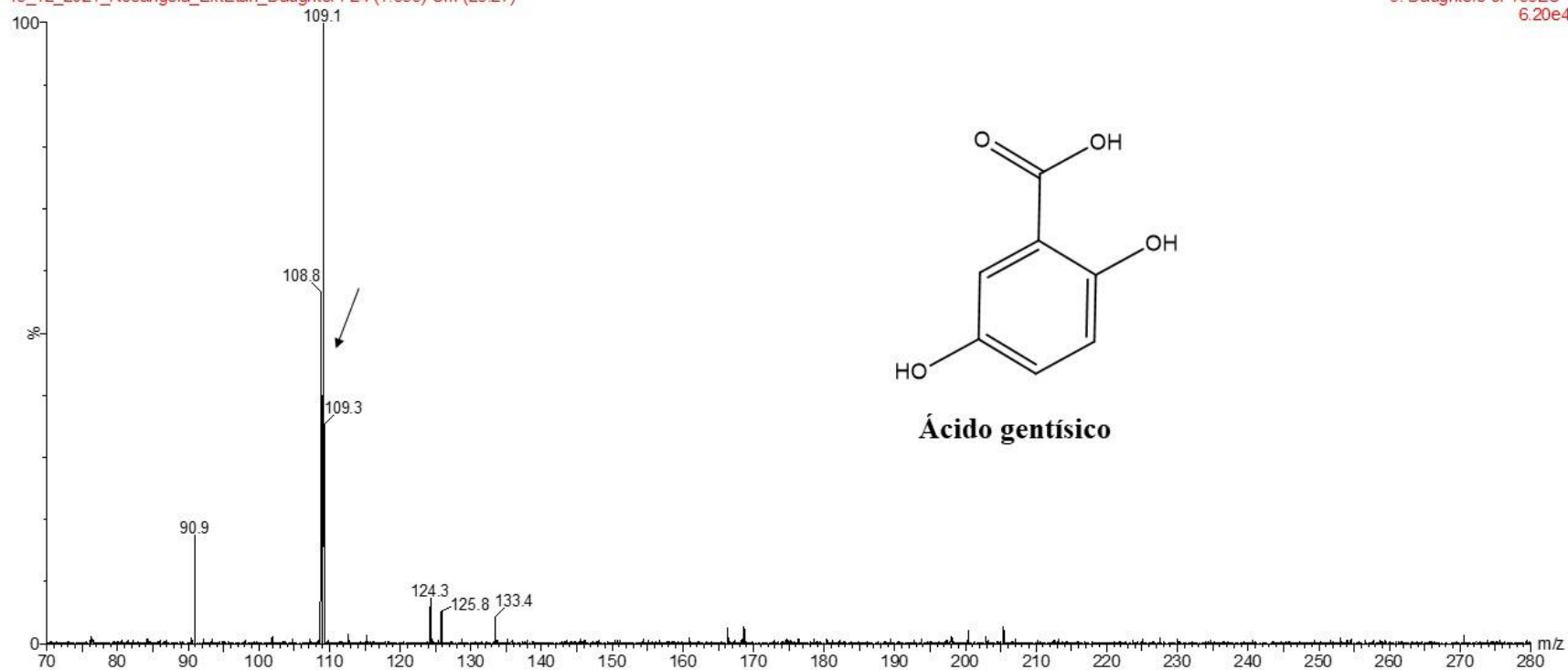


Figura 70. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 153 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido gentísico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter1

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter1 13 (0.903) Cm (13:15)

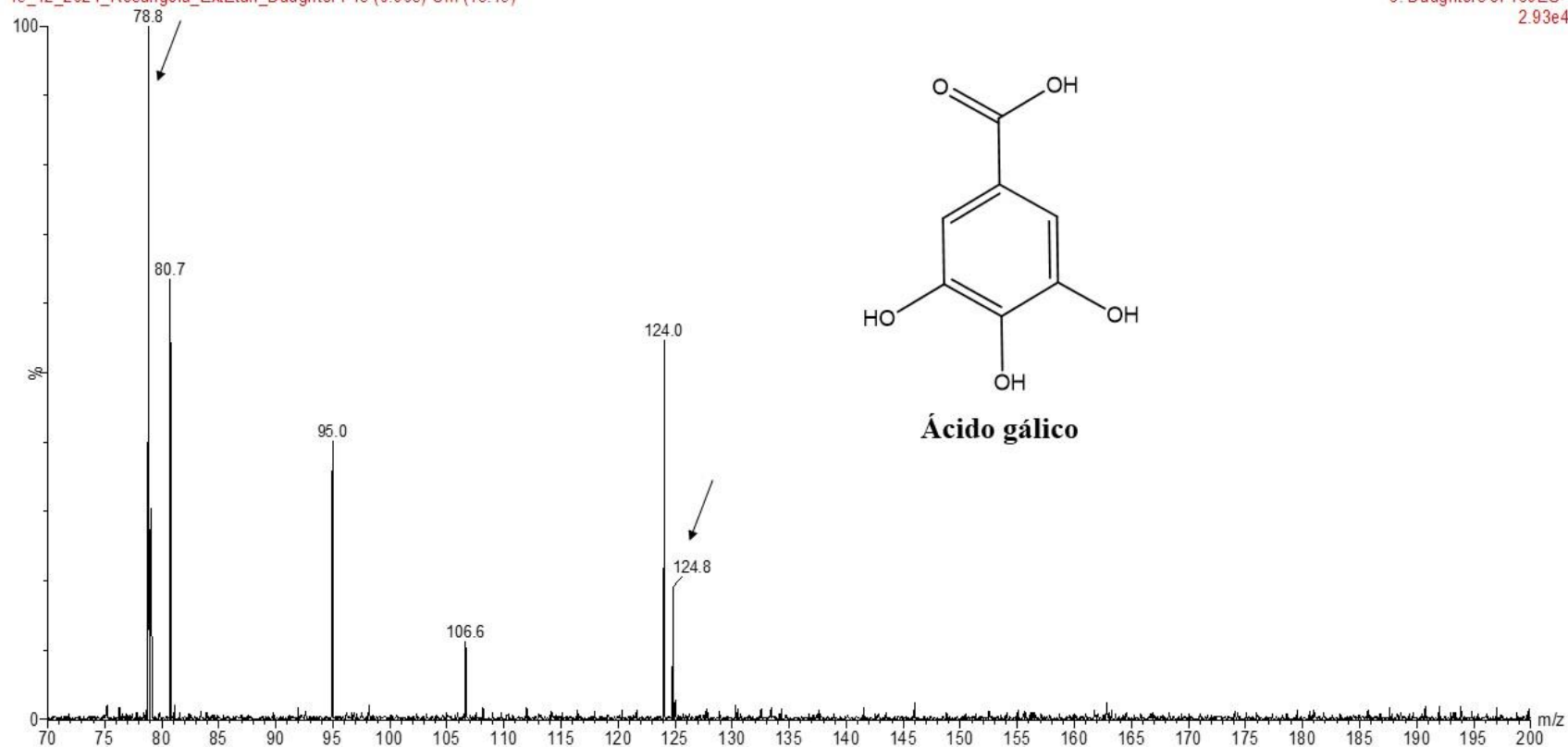
6: Daughters of 169ES-
2.93e4

Figura 71. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 169 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido gálico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

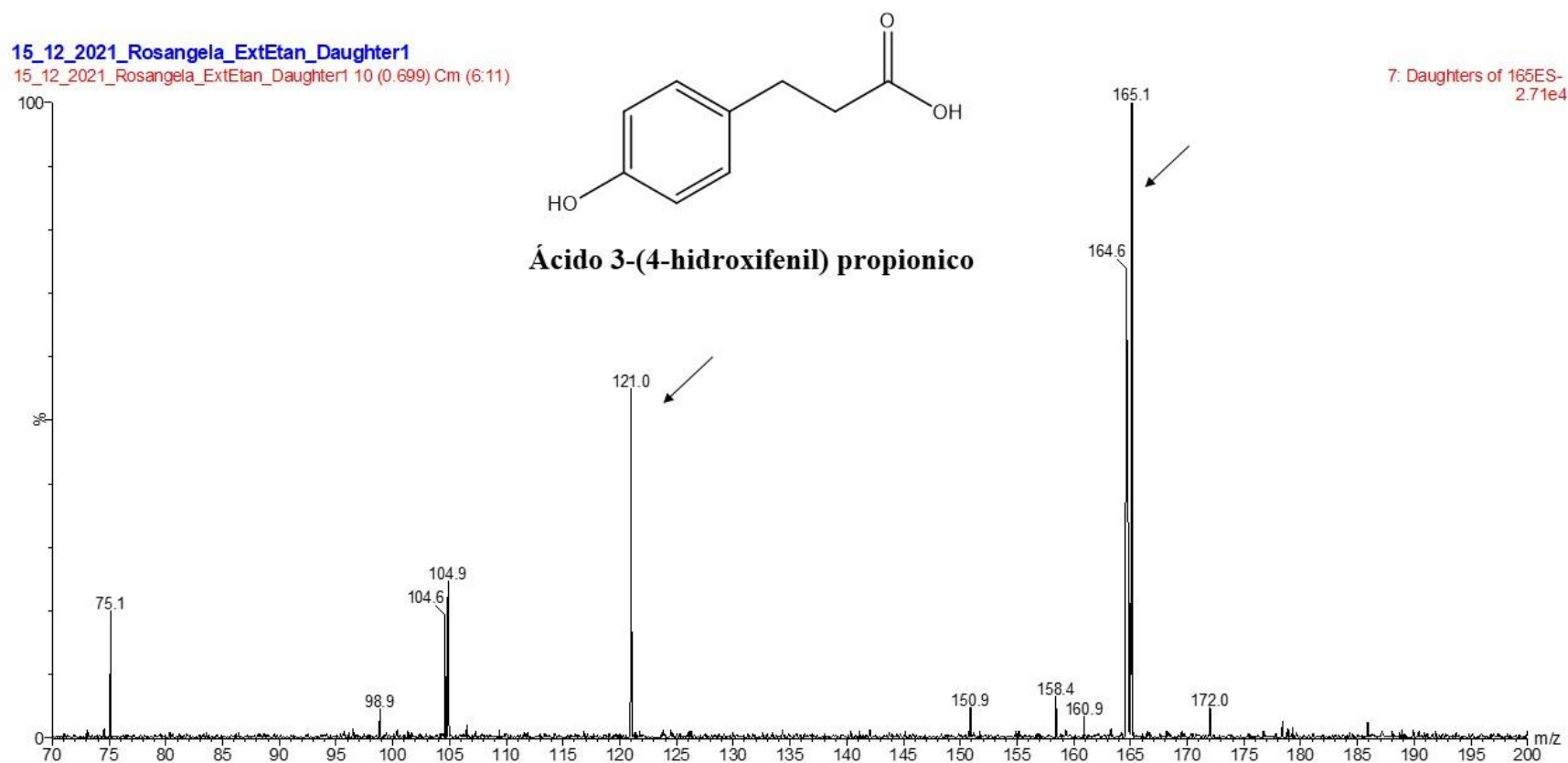


Figura 72. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 165 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido 3-(4-hidroxifenil) propionico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

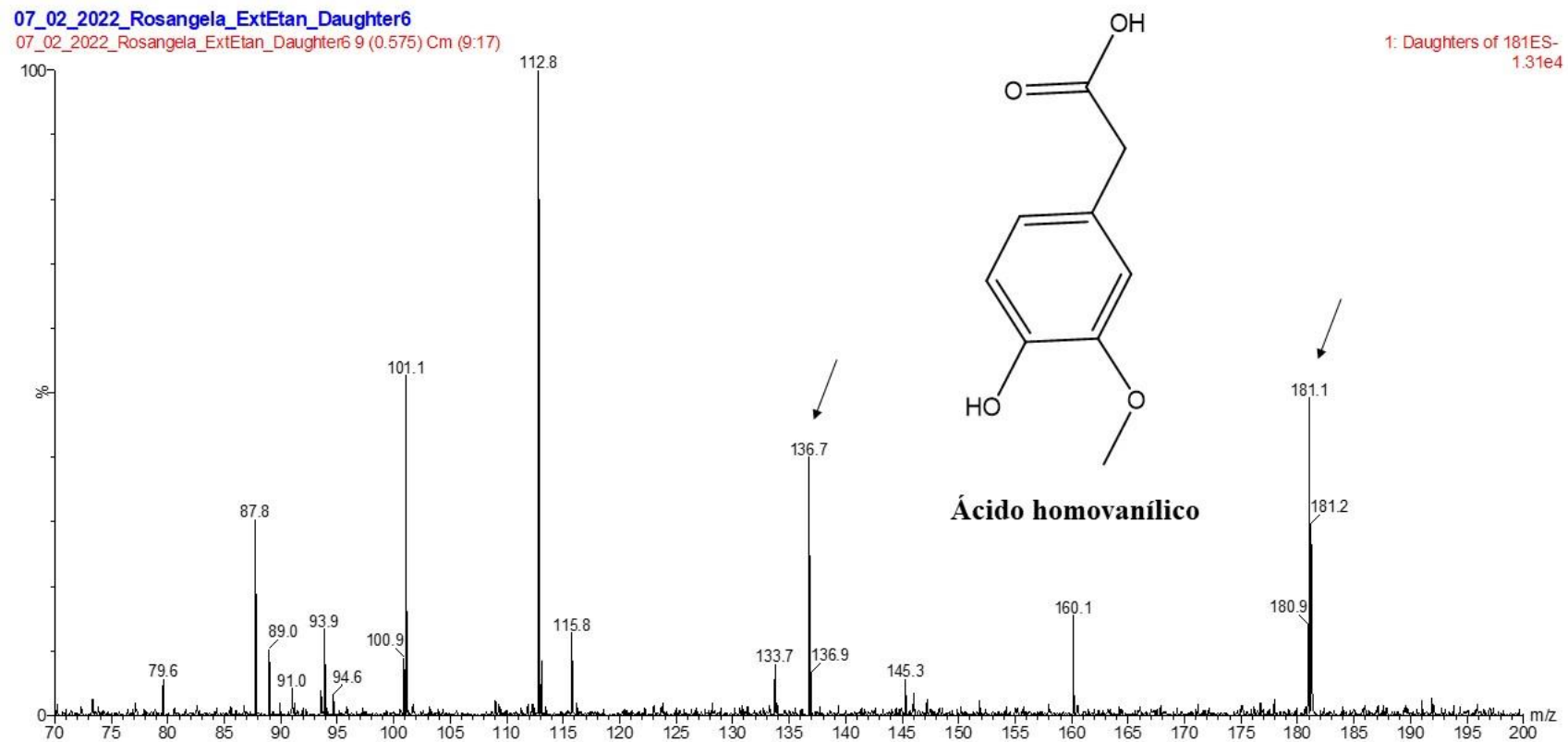


Figura 73. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 181 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido homovanílico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

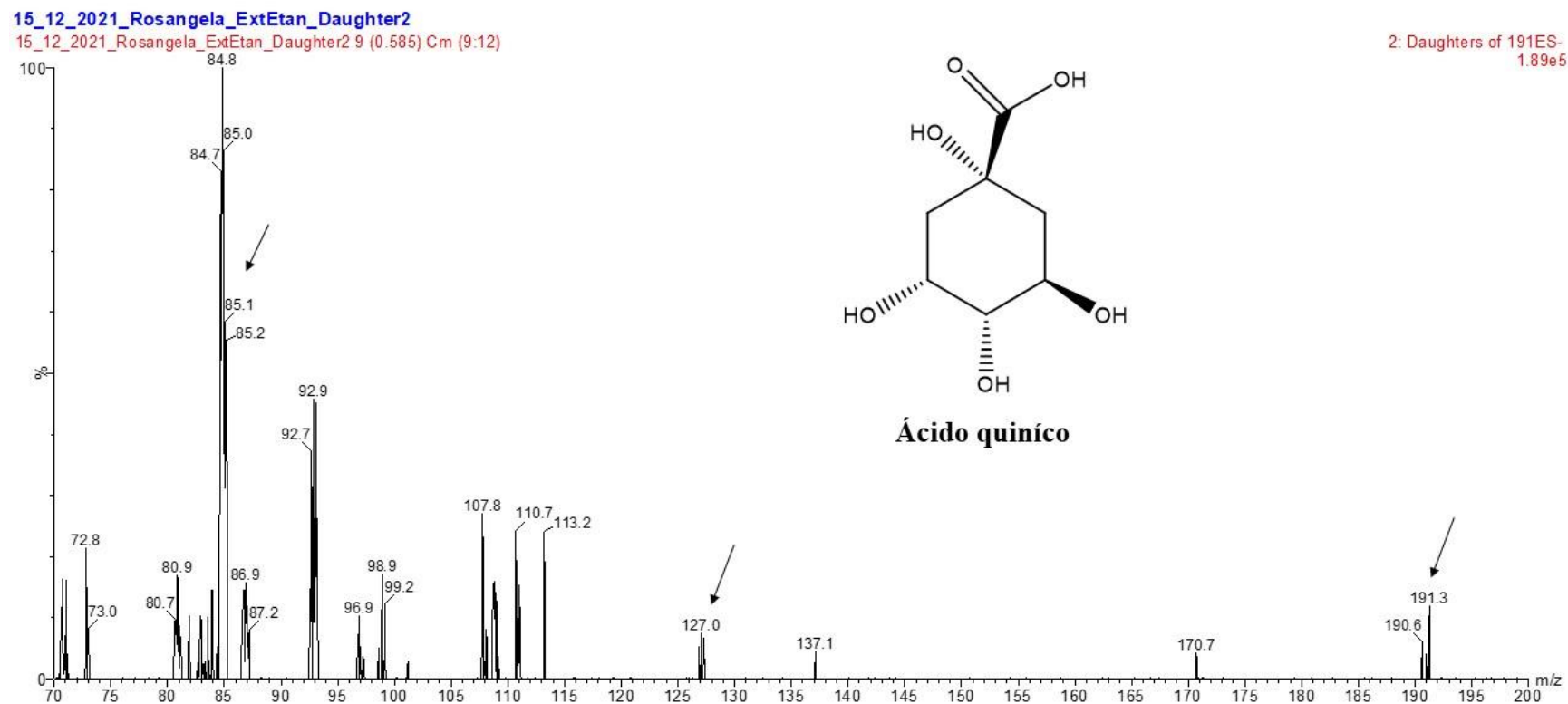


Figura 74. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 191 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido quinico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

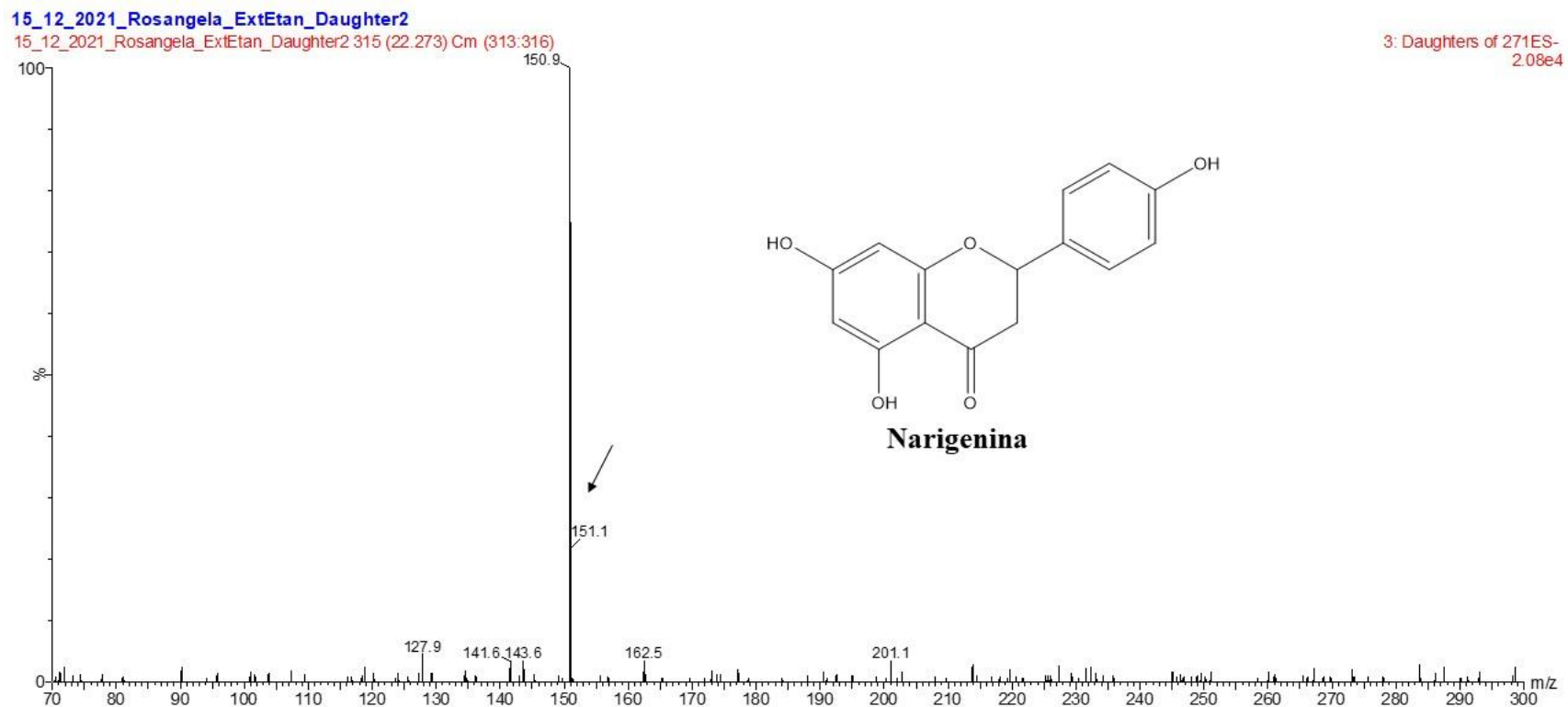


Figura 75. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 271 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância narigenina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter2

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter2 299 (21.149) Cm (297:300)

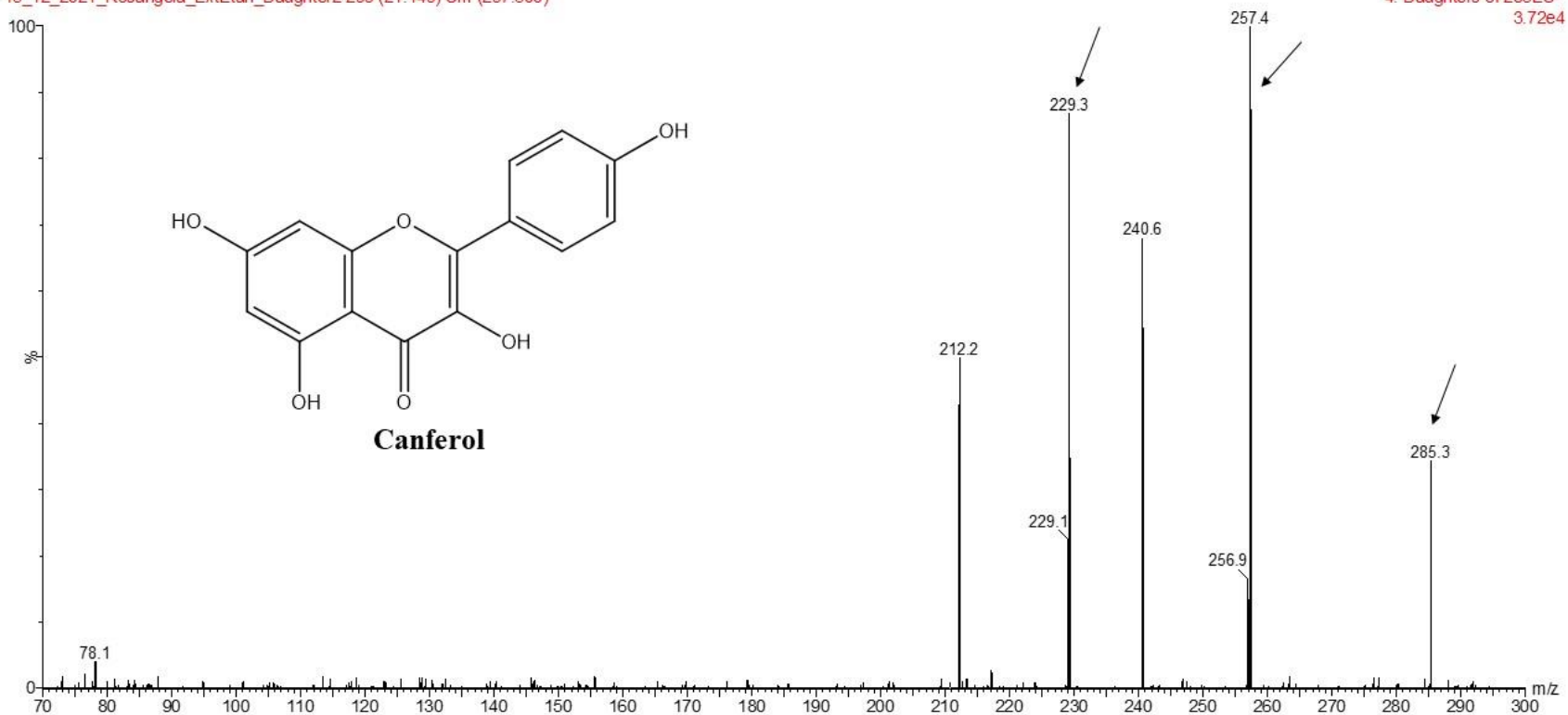


Figura 76. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 285 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância canferol no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter2

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter2 54 (3.799) Cm (51:56)

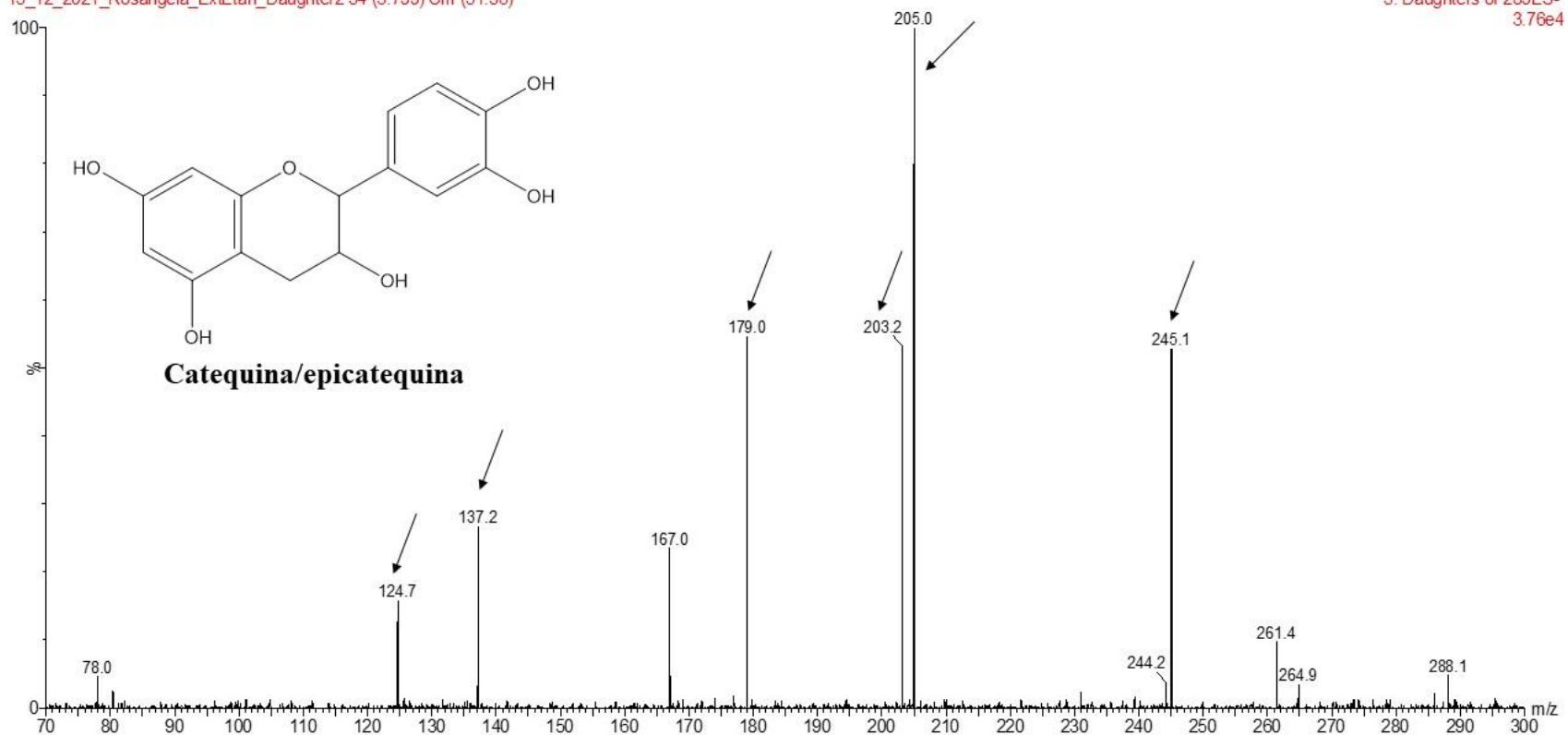


Figura 77. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 289 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância catequina/epicatequina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

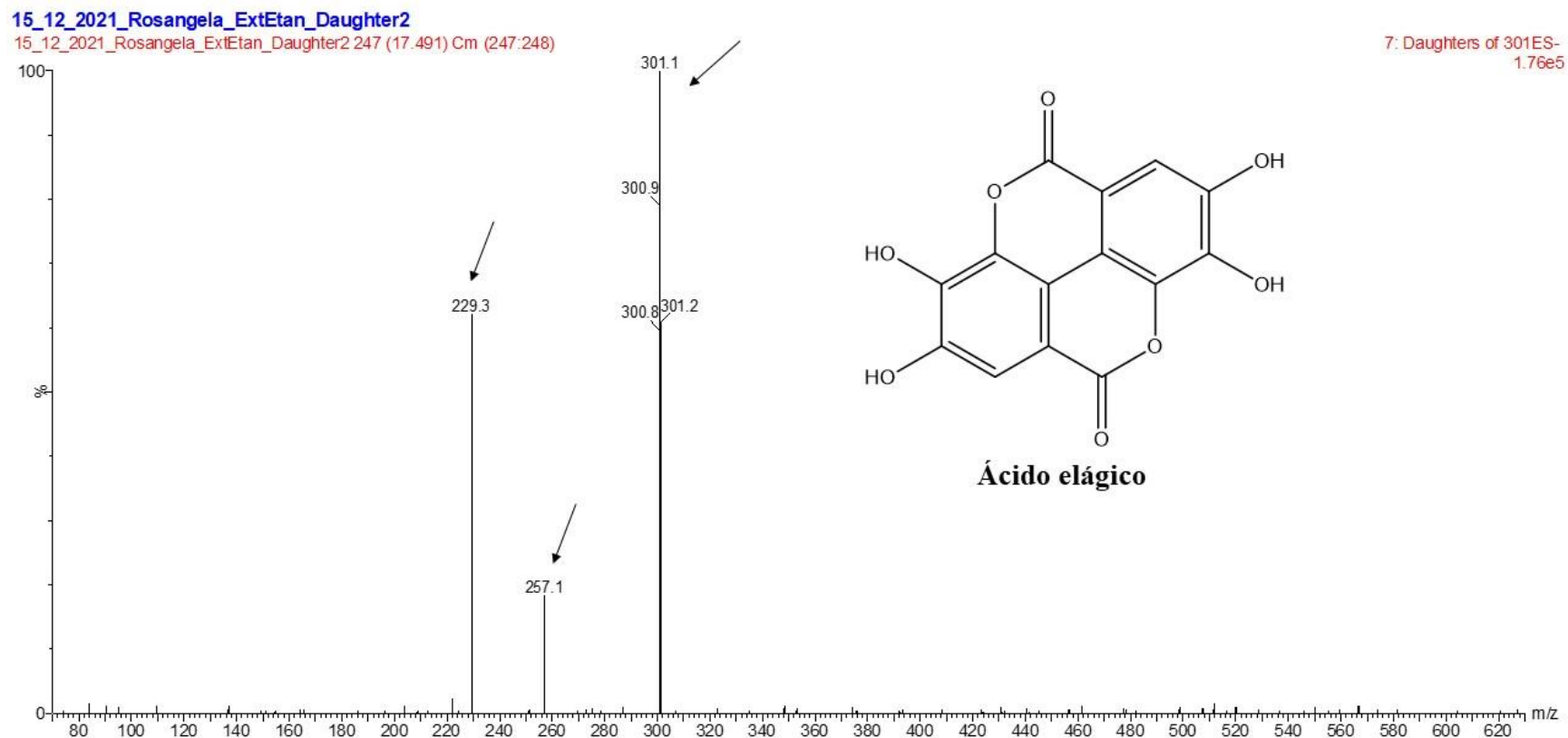


Figura 78. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 301 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância ácido elágico no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

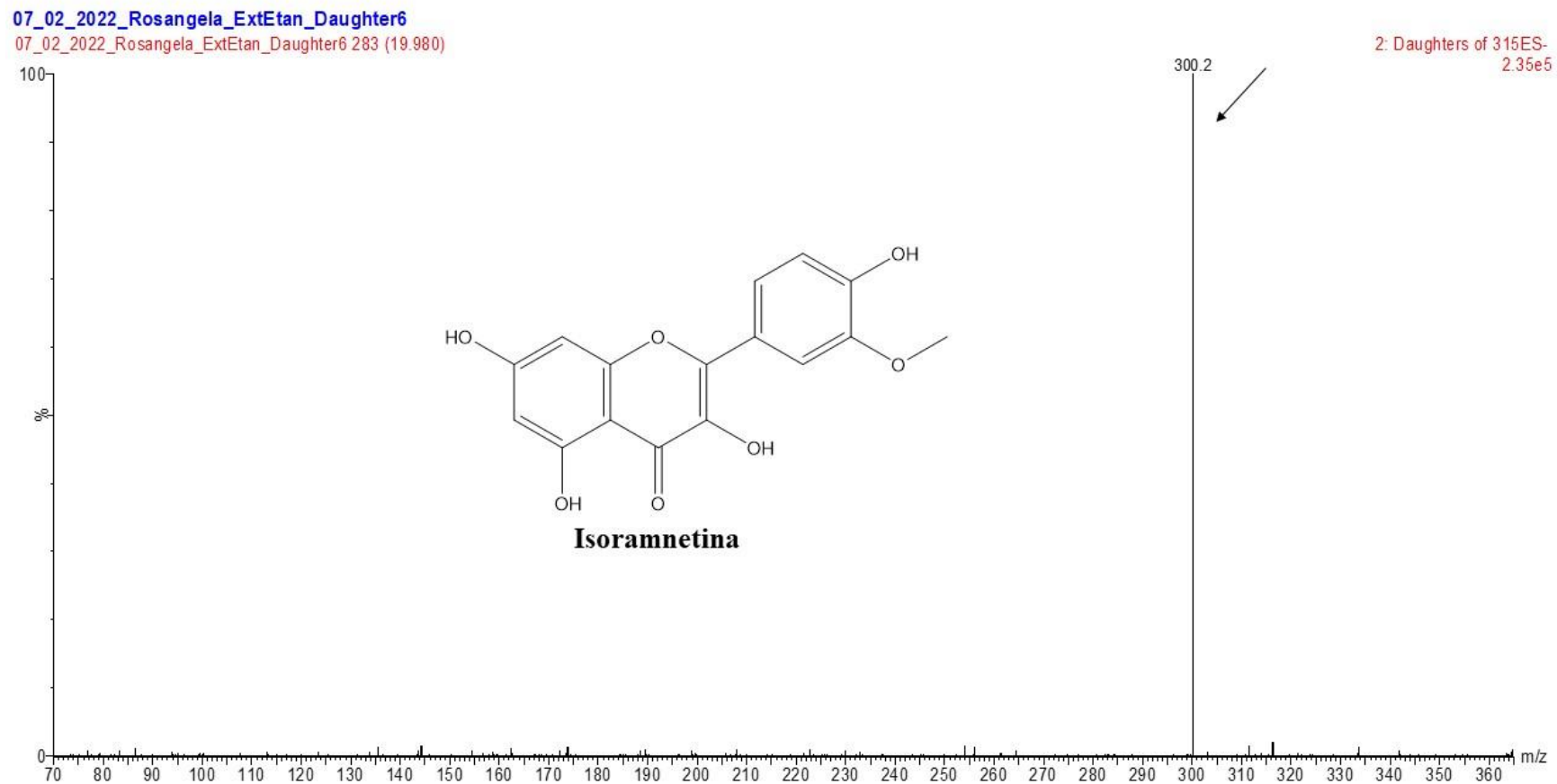


Figura 79. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 315 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância isoramnetina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

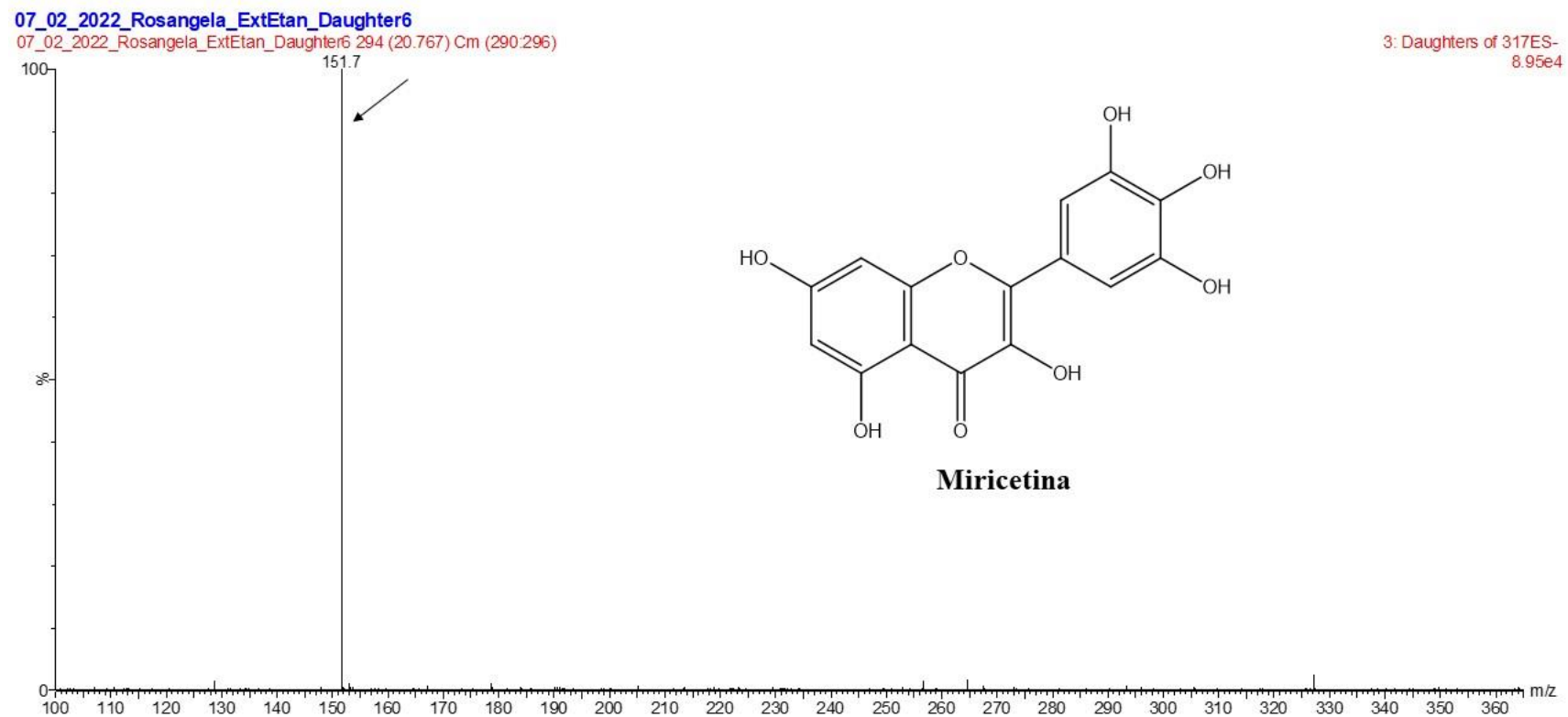


Figura 80. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 317 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância miricetina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

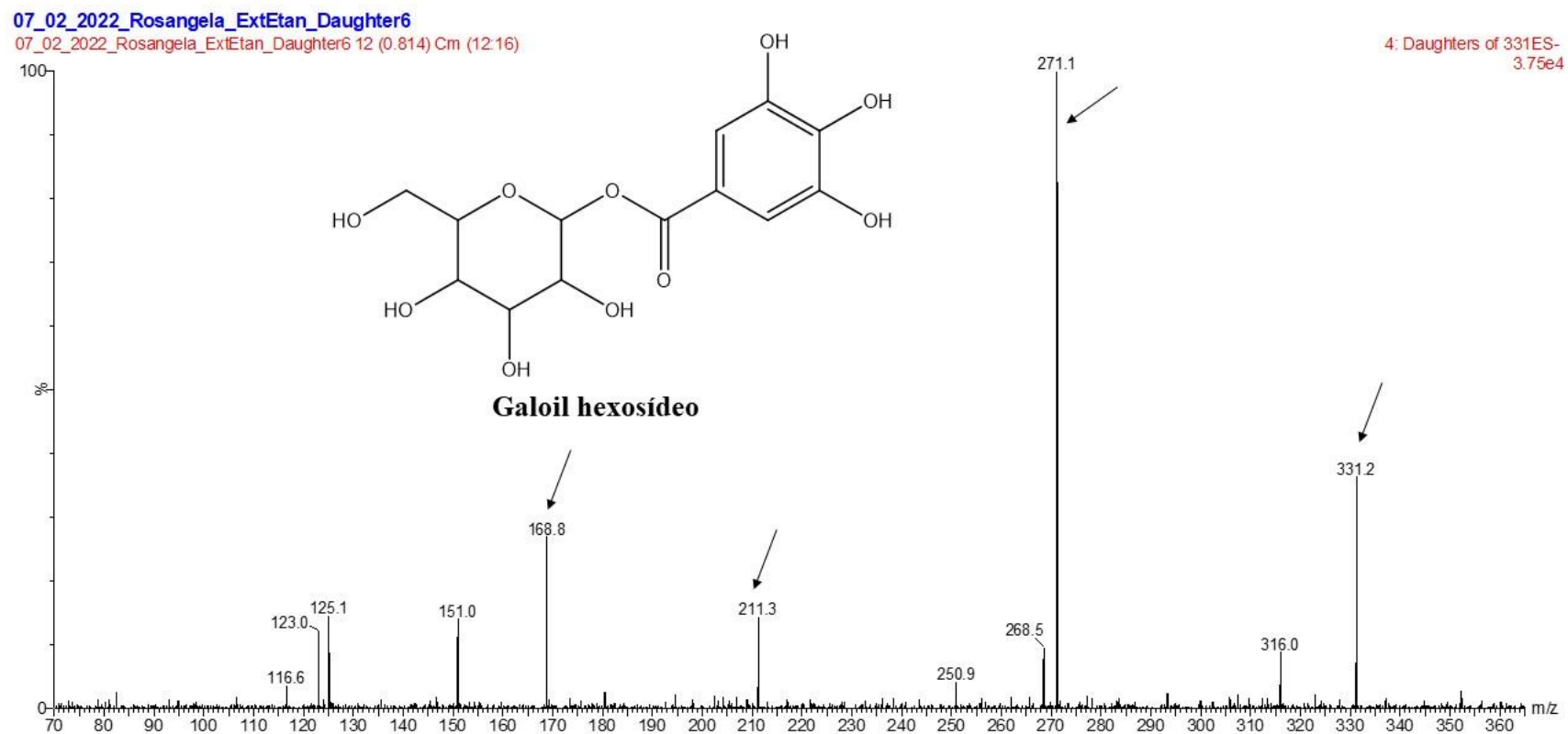


Figura 81. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 331 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância galoil hexosídeo no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

07_02_2022_Rosangela_ExtEtan_Daughter6

07_02_2022_Rosangela_ExtEtan_Daughter6 242 (17.131) Cm (234:269)

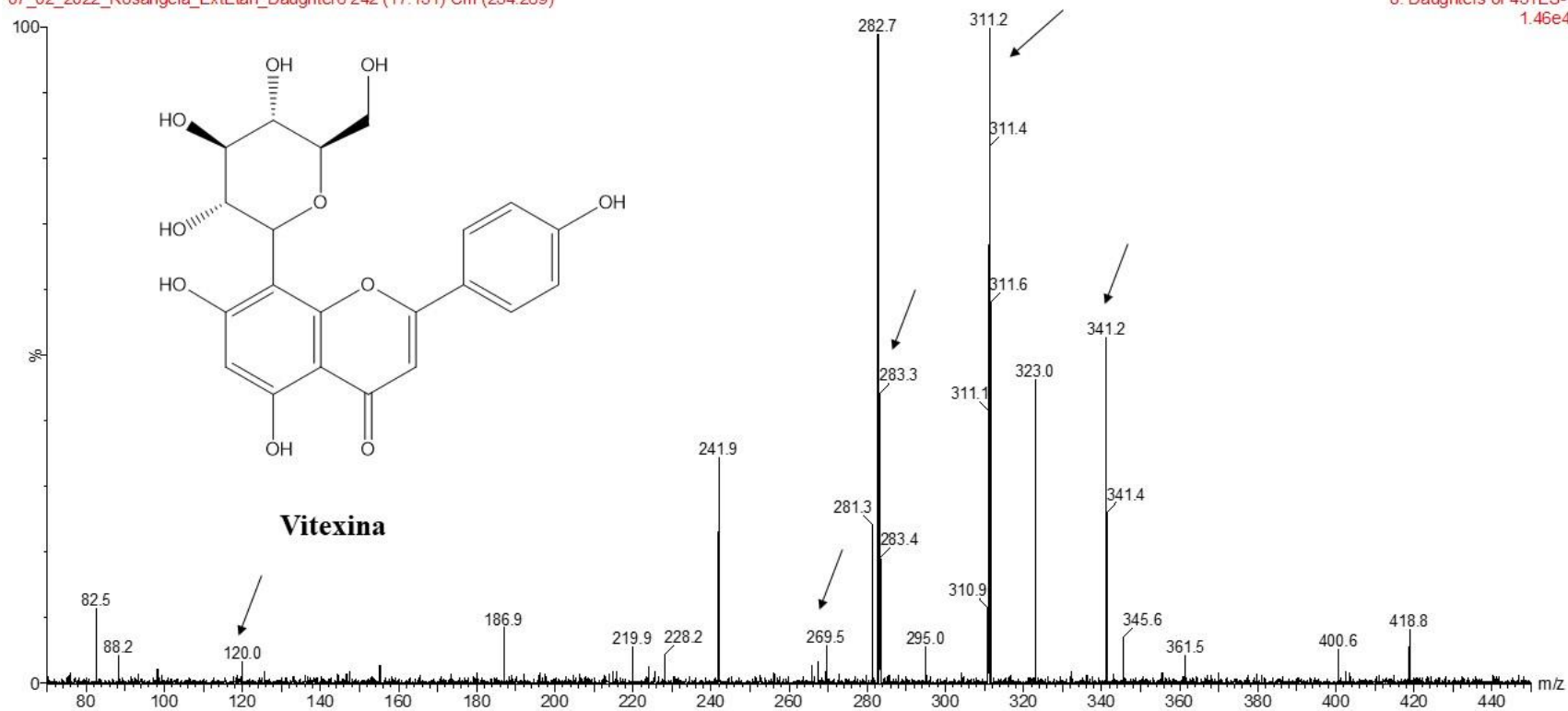
8: Daughters of 431ES-
1.46e4

Figura 82. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 431 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância vitexina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter3

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter3 269 (19.001) Cm (269.277)

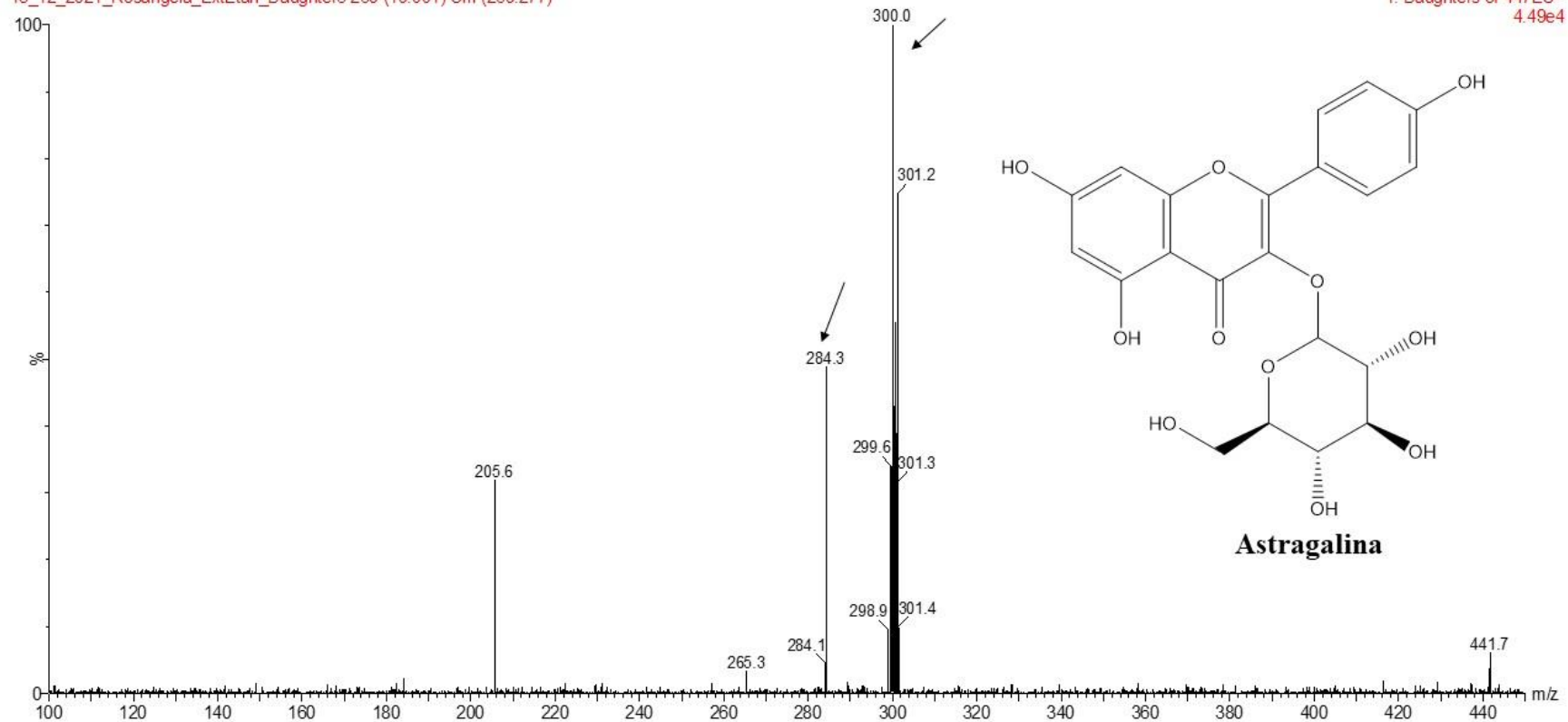


Figura 83. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 447 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância astragalina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter3

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter3 270 (19.081) Cm (266:275)

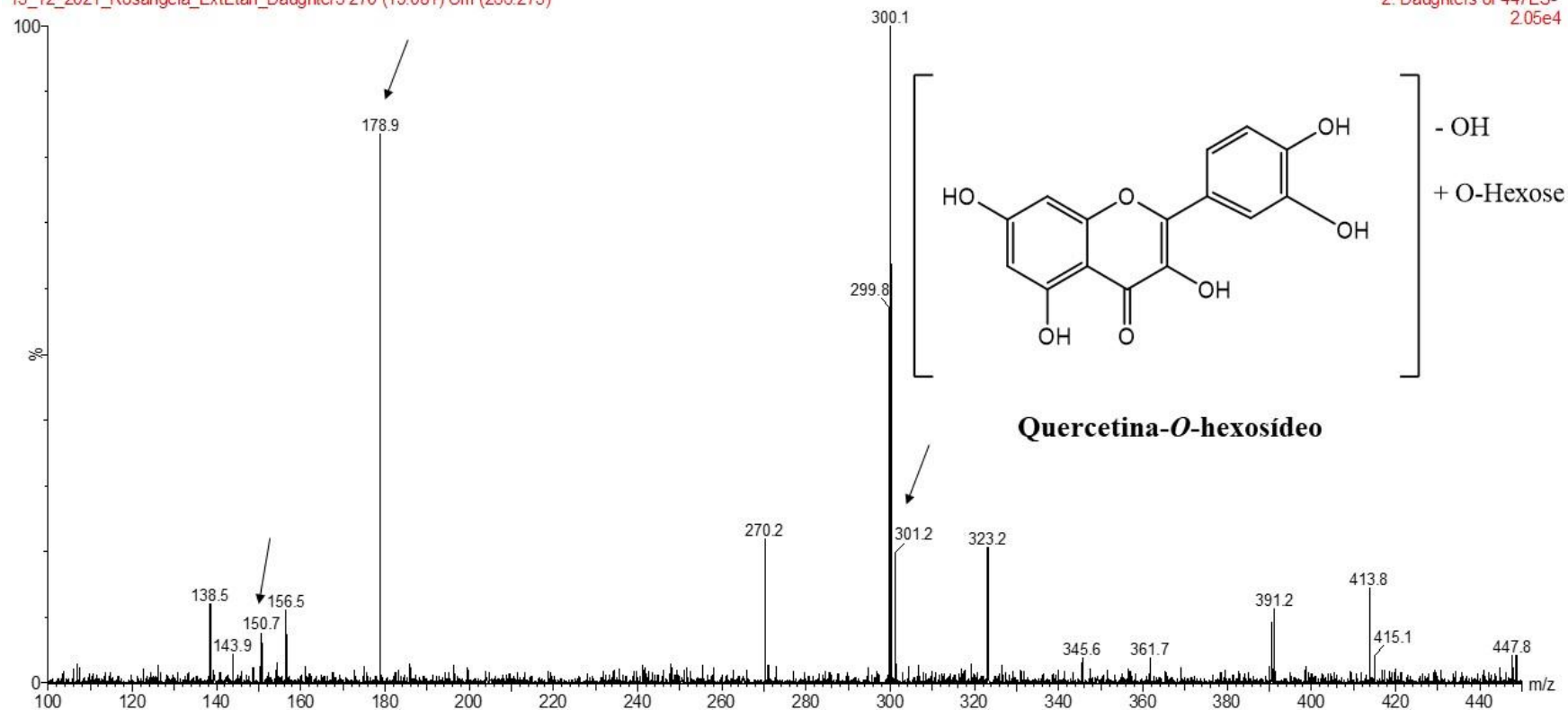


Figura 84. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 447 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância quercetina-O-hexosídeo no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

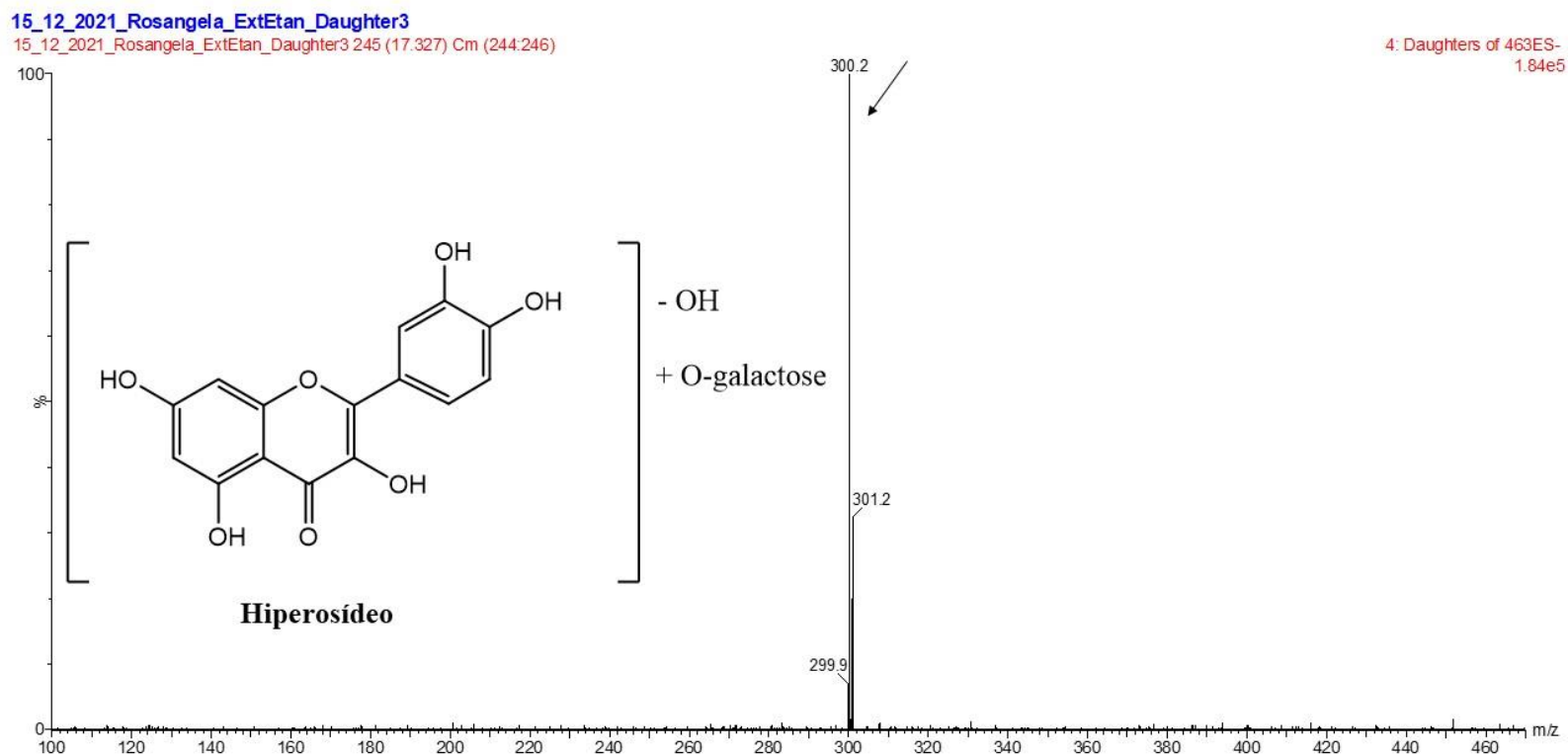


Figura 85. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 463 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância hiperosídeo no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

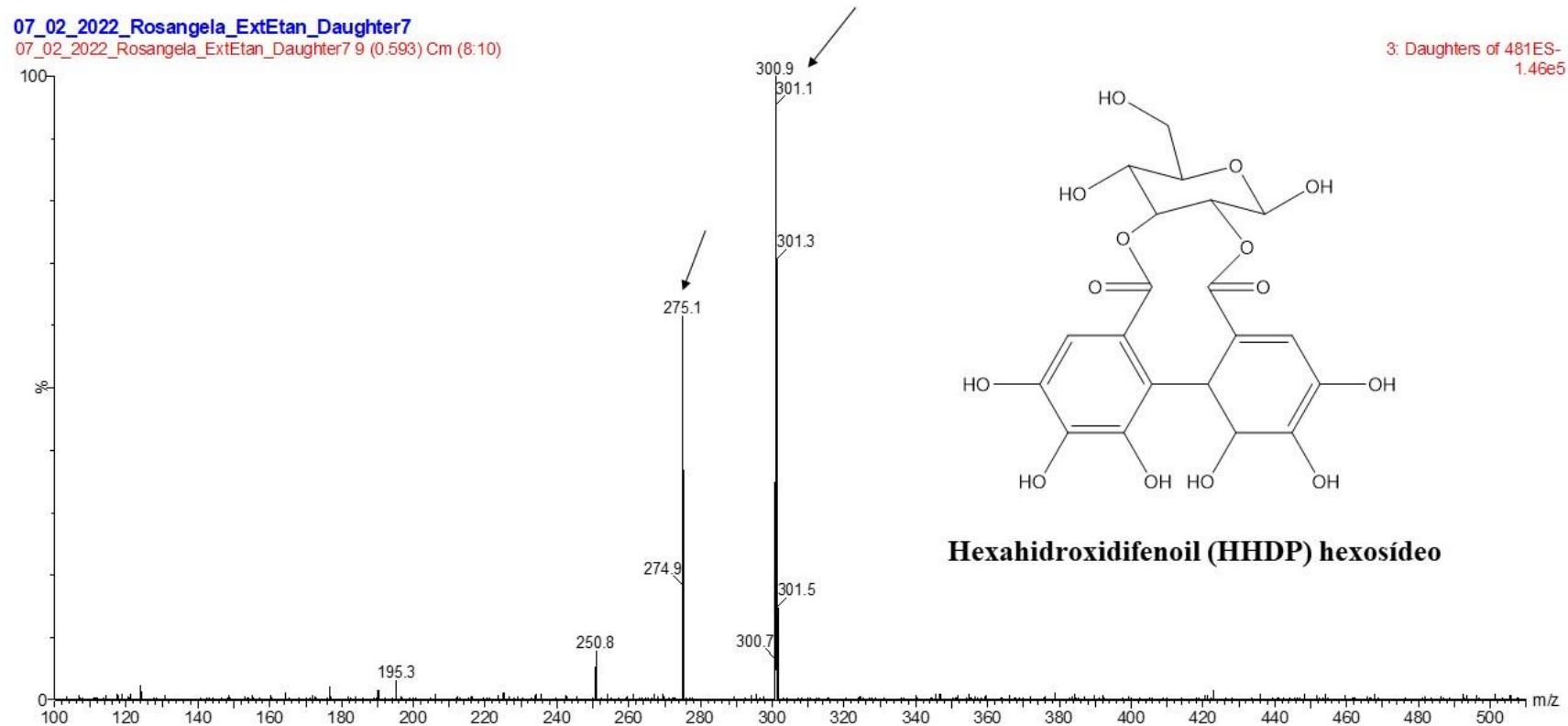


Figura 86. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 481 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância hexahidroxidifenol (HHDP) hexosídeo no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

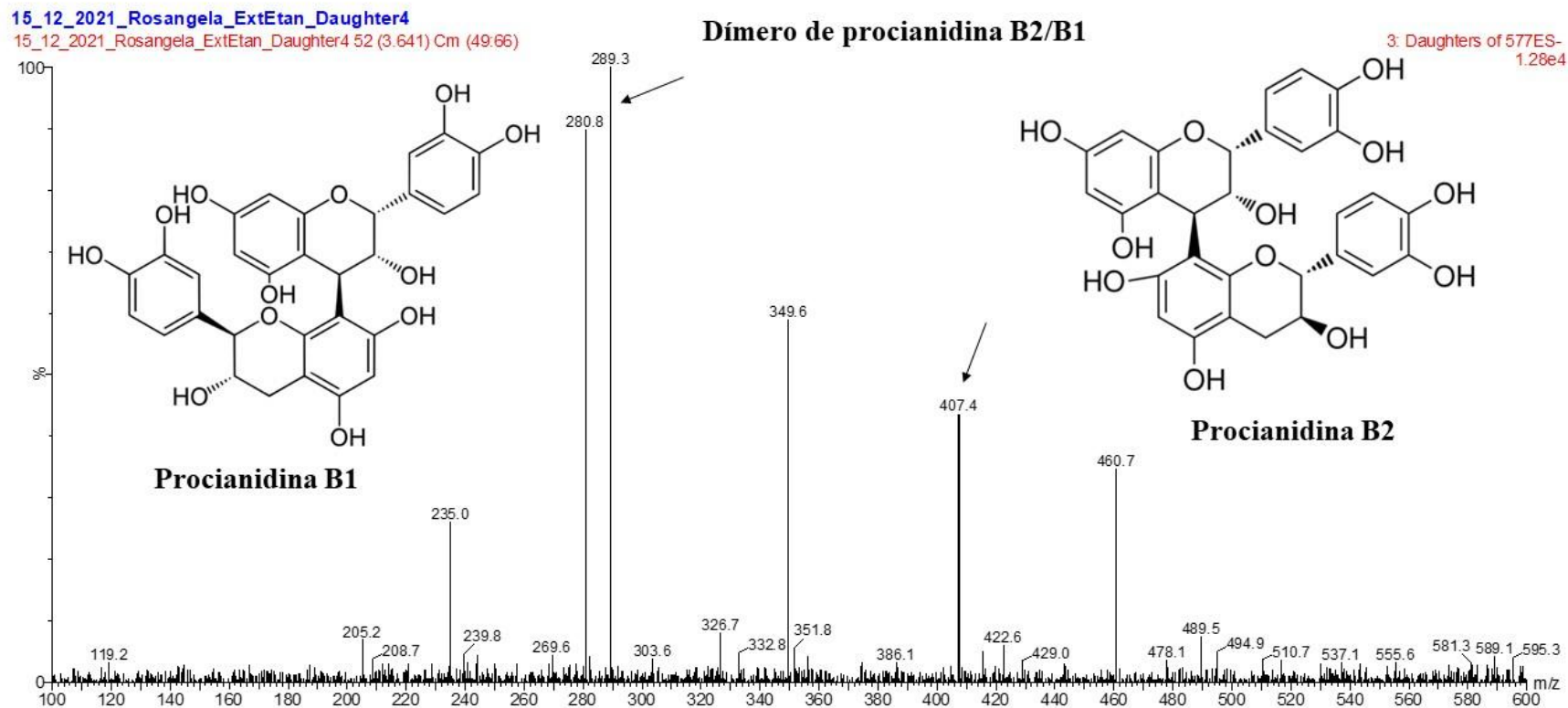


Figura 87. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 577 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância procianidina dimérica B2/B1 no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

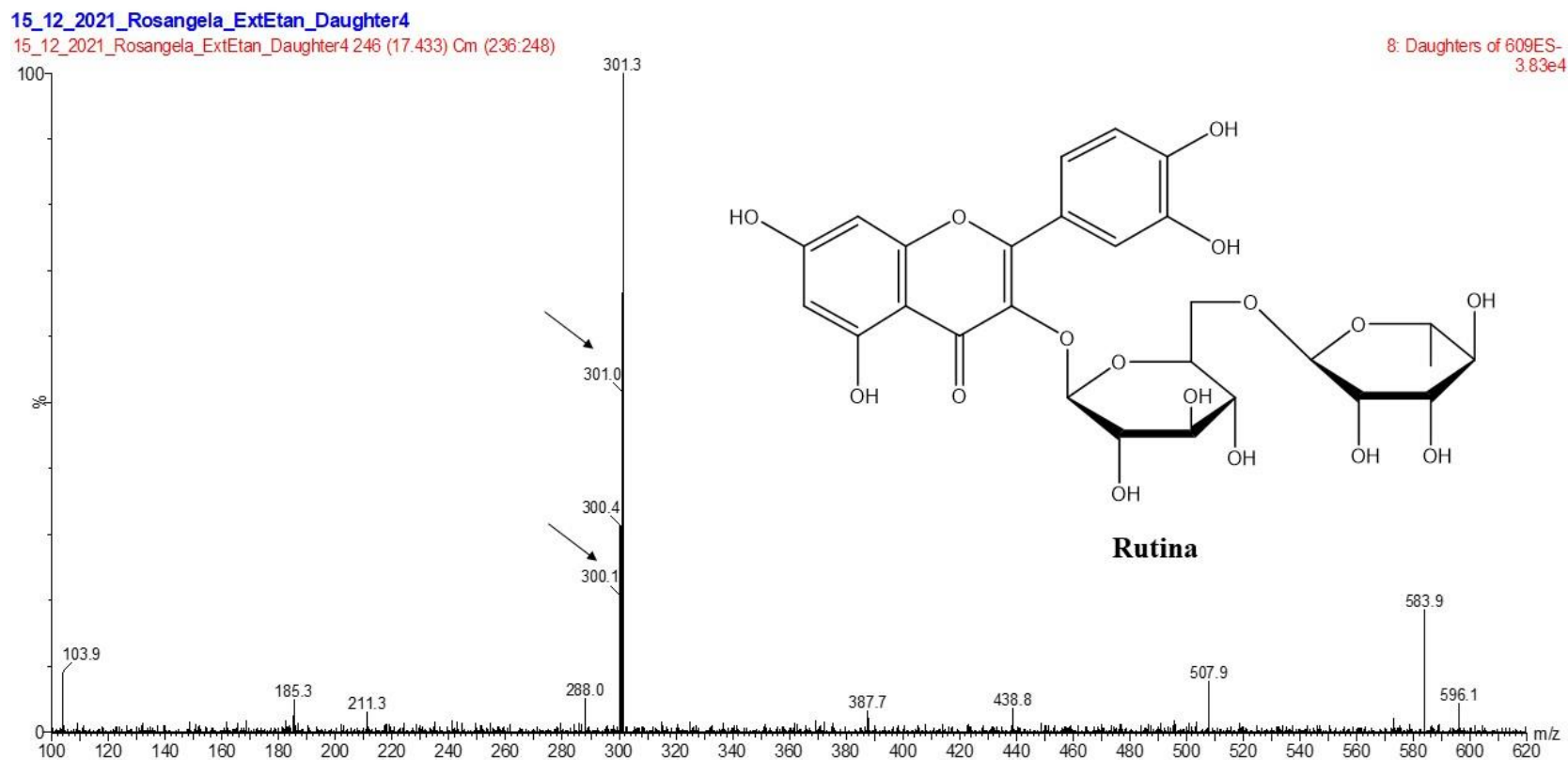


Figura 88. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 609 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância rutina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

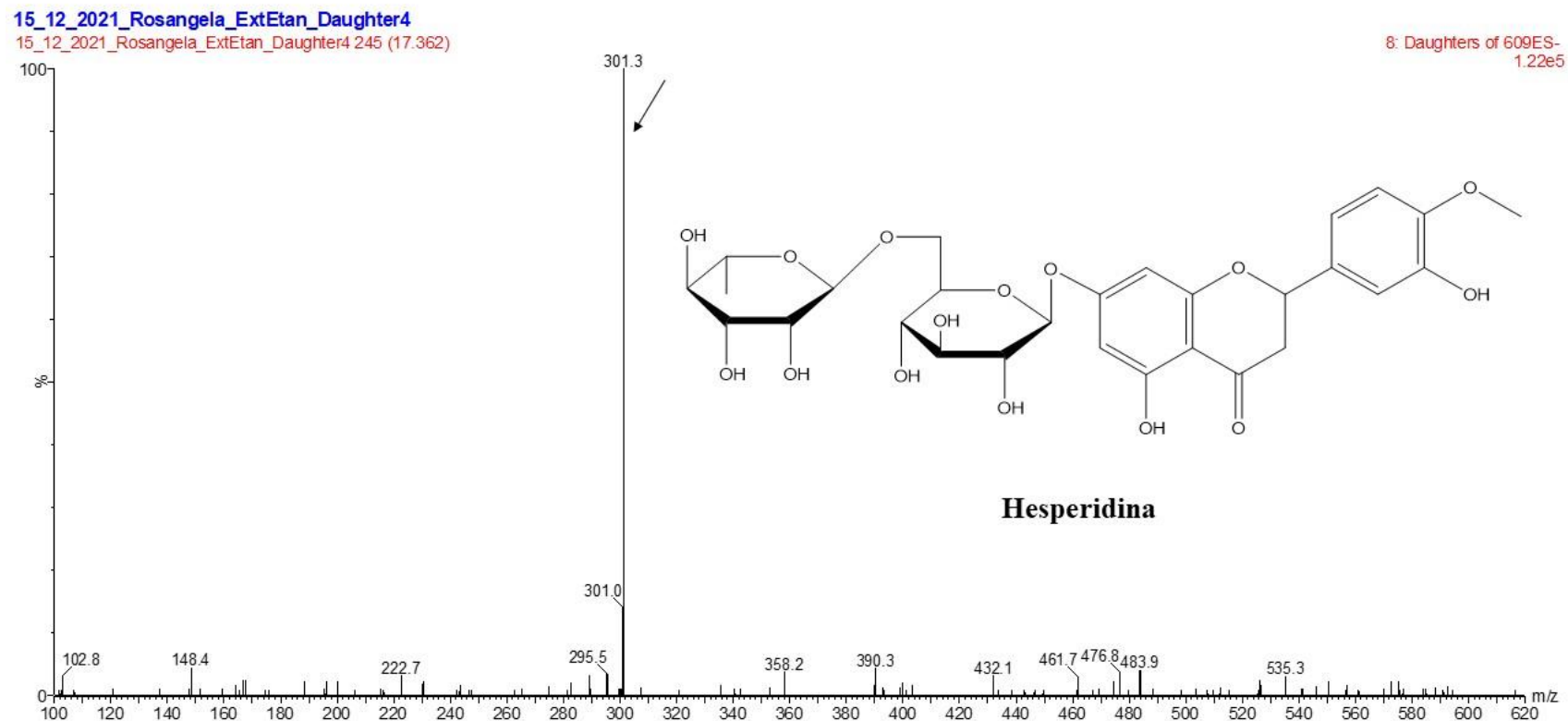


Figura 89. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 609 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância hesperidina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

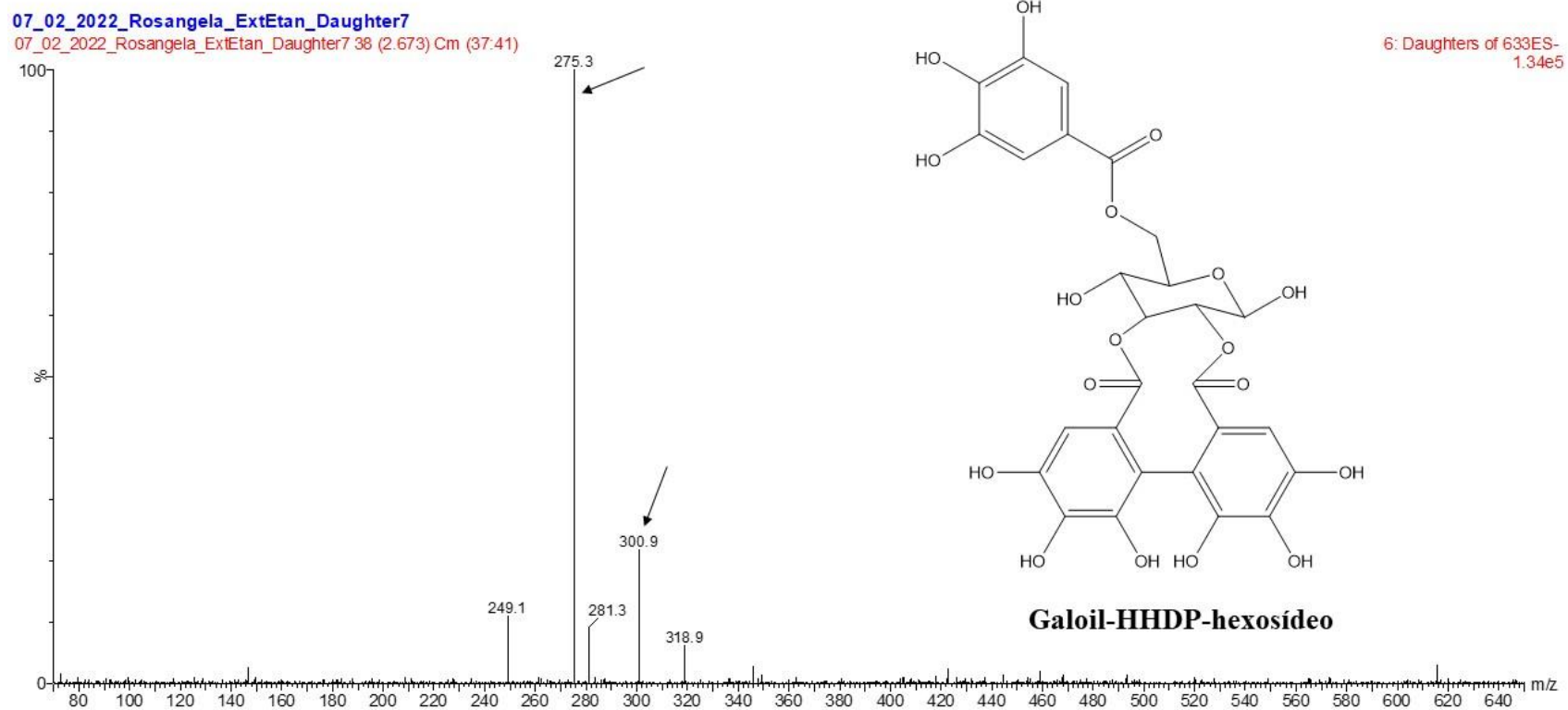


Figura 90. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 633 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância galoil-HHDP-hexosídeo no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

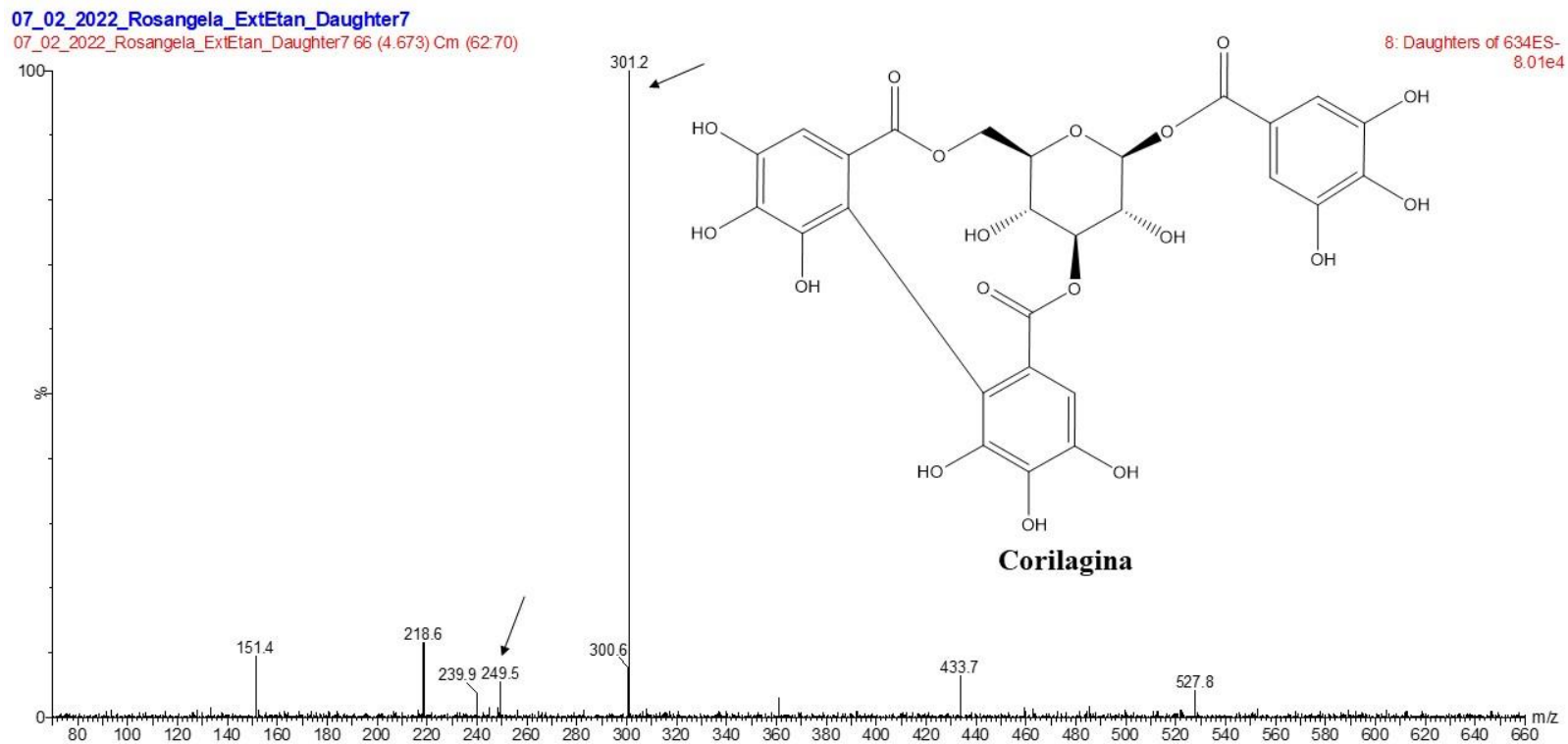


Figura 91. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 634 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância corilagina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

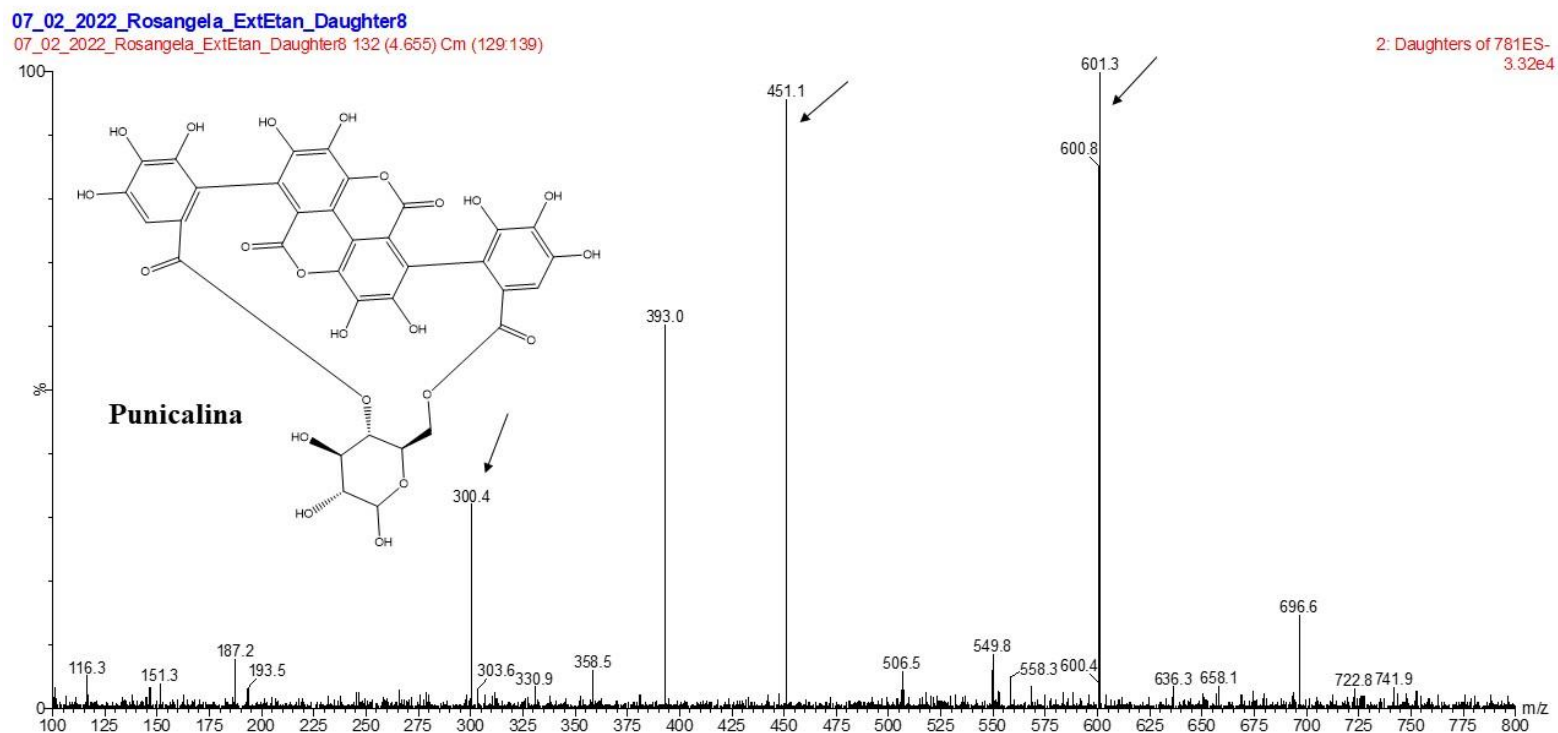


Figura 92. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 781 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância punicalina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

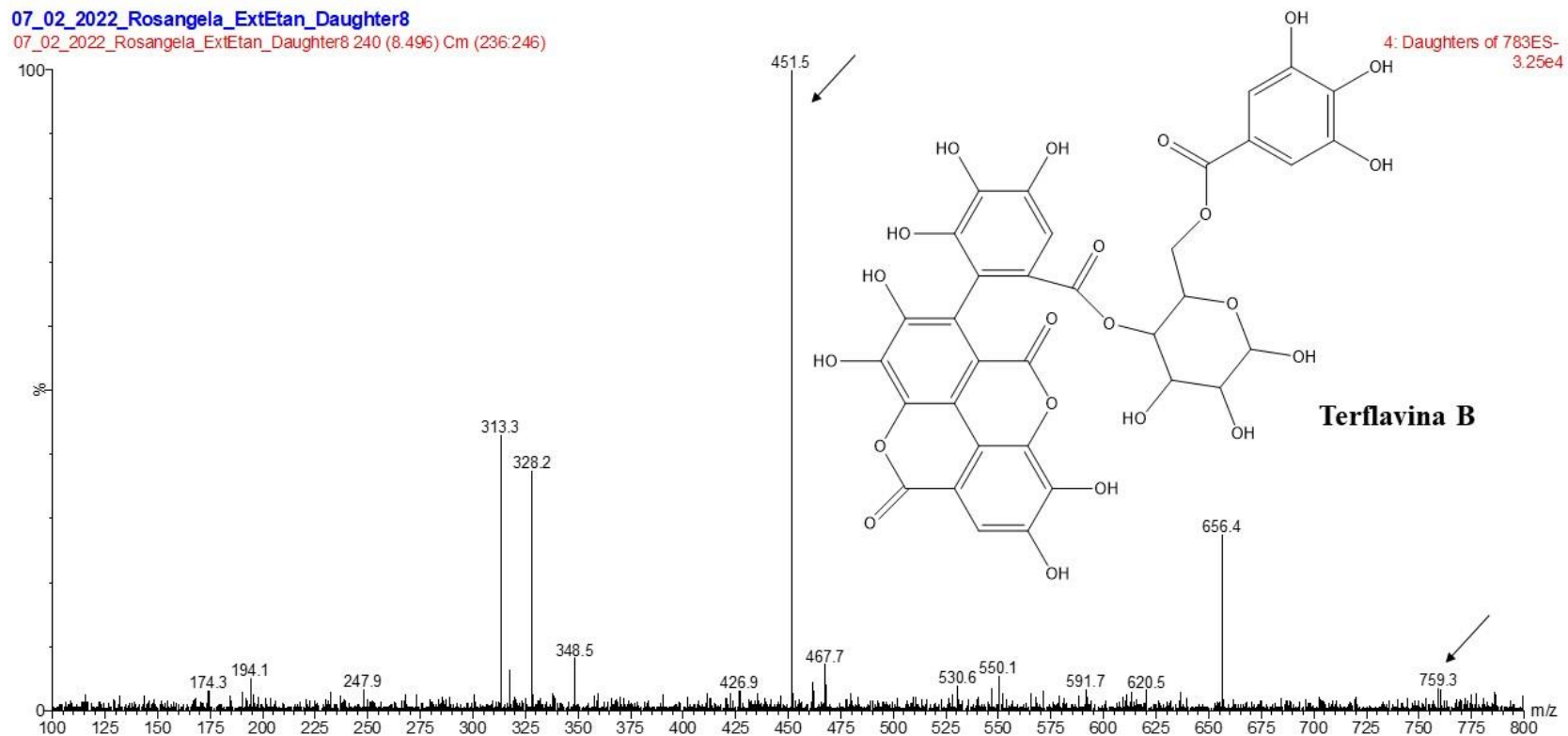


Figura 93. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 783 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância terflavina B no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter5

15_12_2021_Rosangela_ExtEtan_Daughter5 140 (4.961) Cm (132:144)

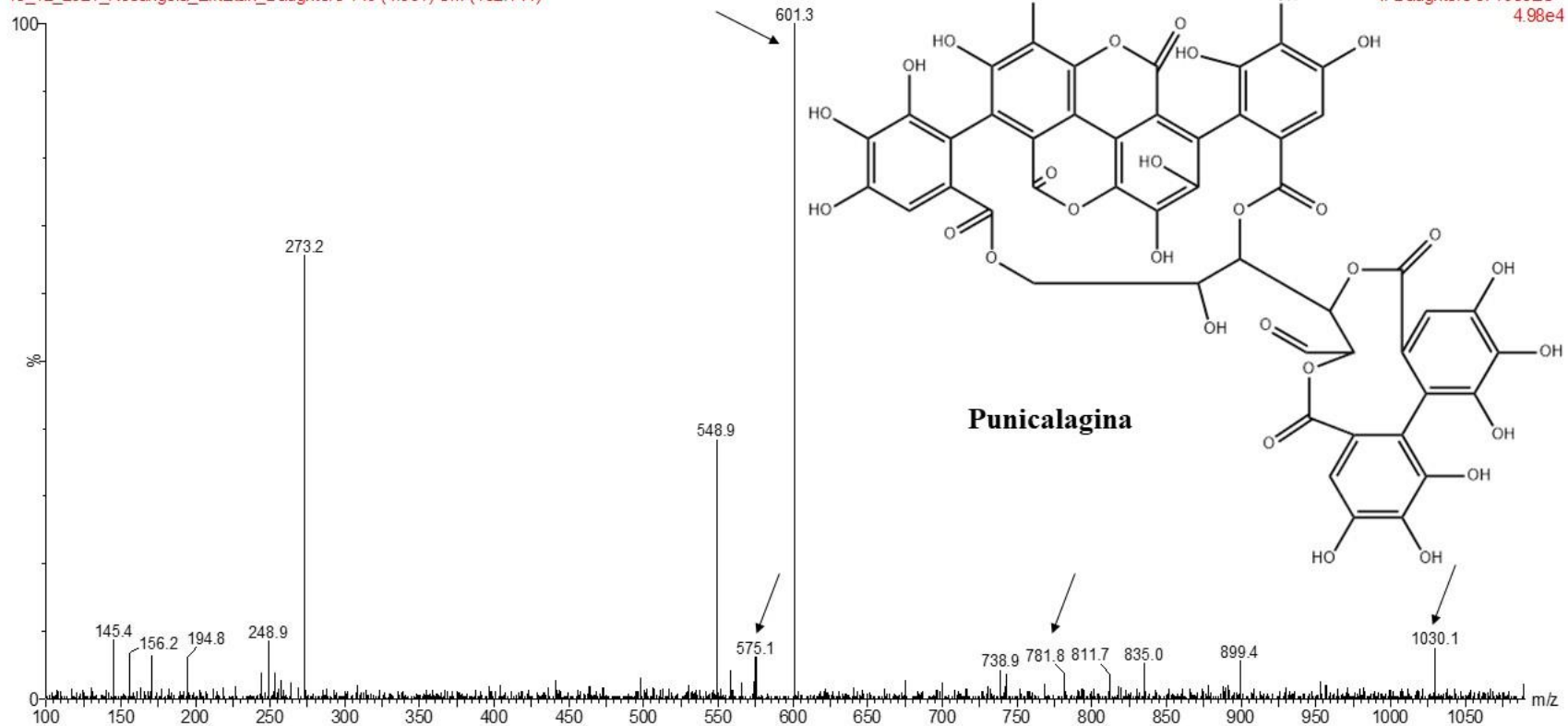


Figura 94. Espectro obtido por UPLC-DAD-ESI-MS/MS no experimento *Daughter scan* (ESI-) para o íon em m/z 1083 Da com seus respectivos íons filhos que permitiram a identificação putativa da substância punicalagina no extrato etanólico (EE) de folhas de *T. glabrescens*. Condições cromatográficas e de MS: vide Parte Experimental, item 4.11.5.

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS

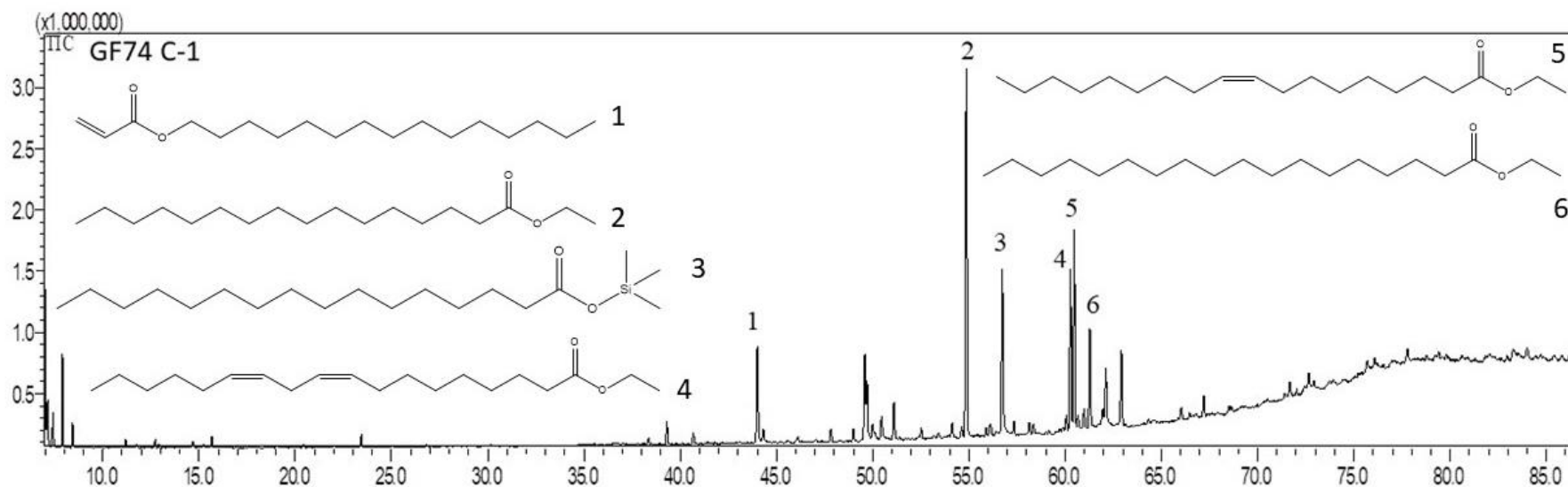


Figura 95. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF74-C1. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= Acrilato de pentadecila; 2 = *n*-hexadecanoato de etila; 3 = *n*-hexadecanoato de trimetilsilila; 4 = Linoleato de etila; 5 = (*Z*)-9-octadecenoato de etila; 6 = Octadecanoato de etila.

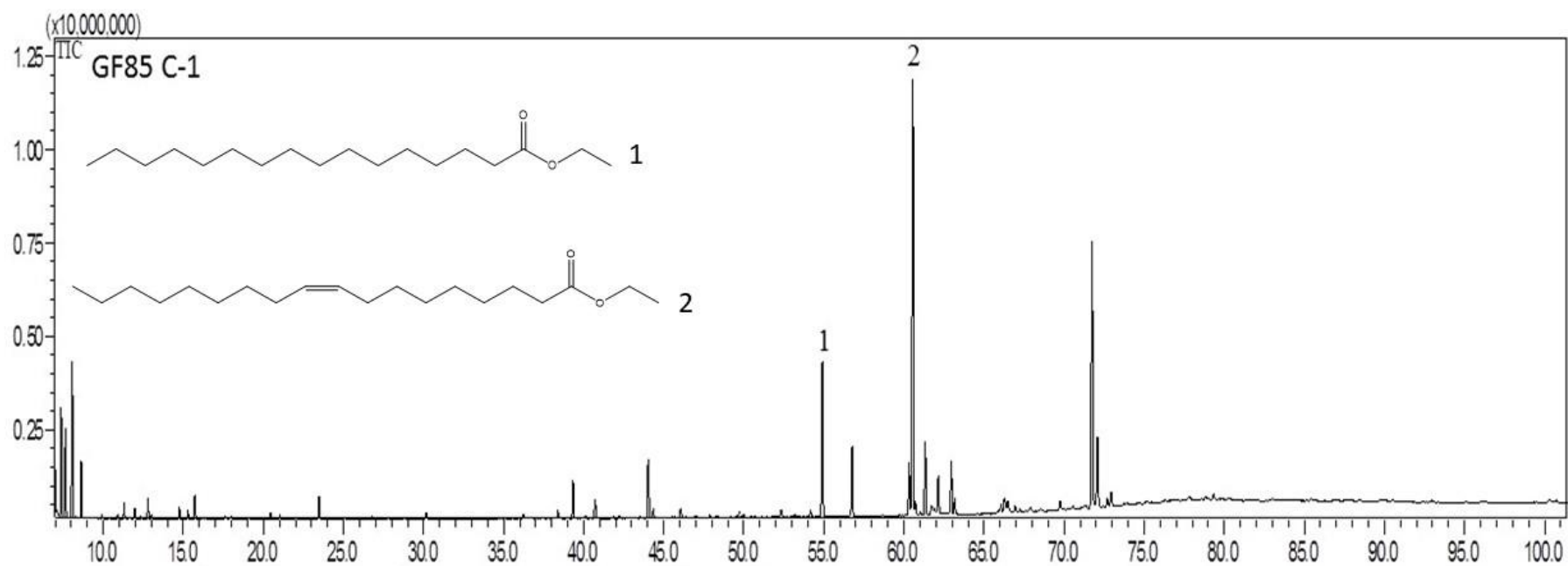


Figura 96. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF85-C1. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= *n*-hexadecanoato de etila; 2 = (*Z*)-9-octadecenoato de etila.

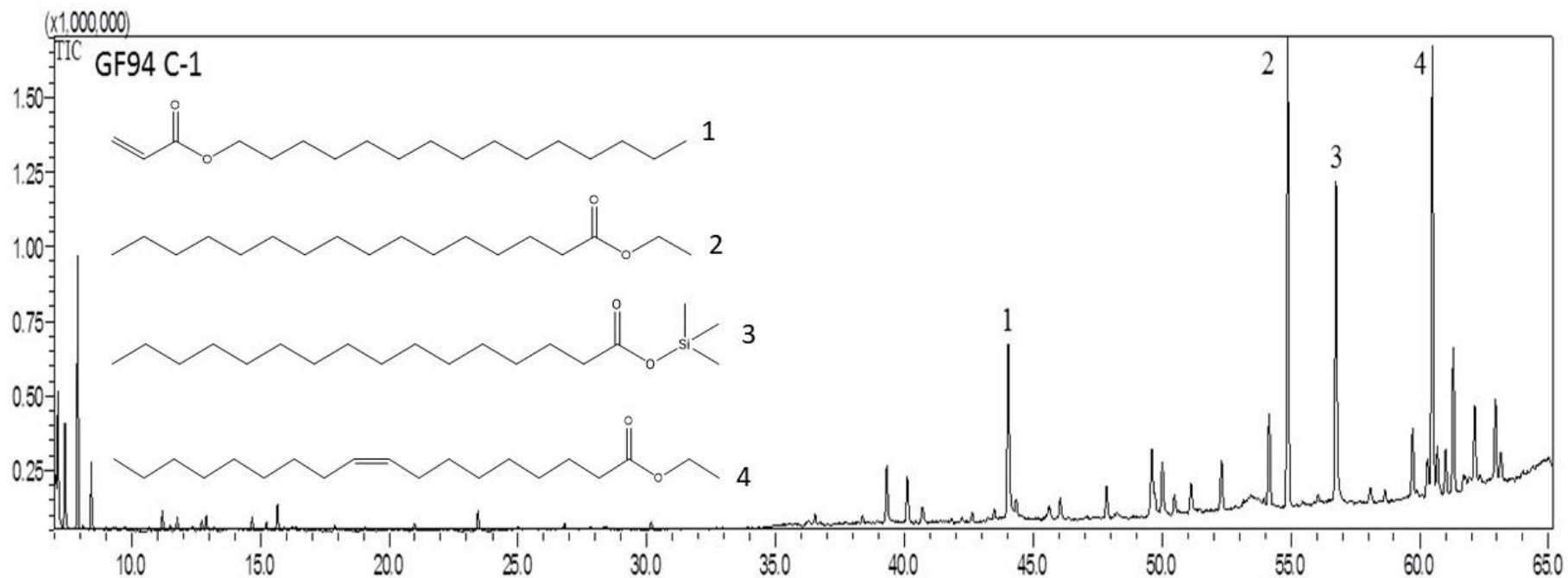


Figura 97. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF94-C1. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= Acrilato de pentadecila; 2 = *n*-hexadecanoato de etila; 3 = *n*-hexadecanoato de trimetilsilila; 4 = (*Z*)-9-octadecenoato de etila.

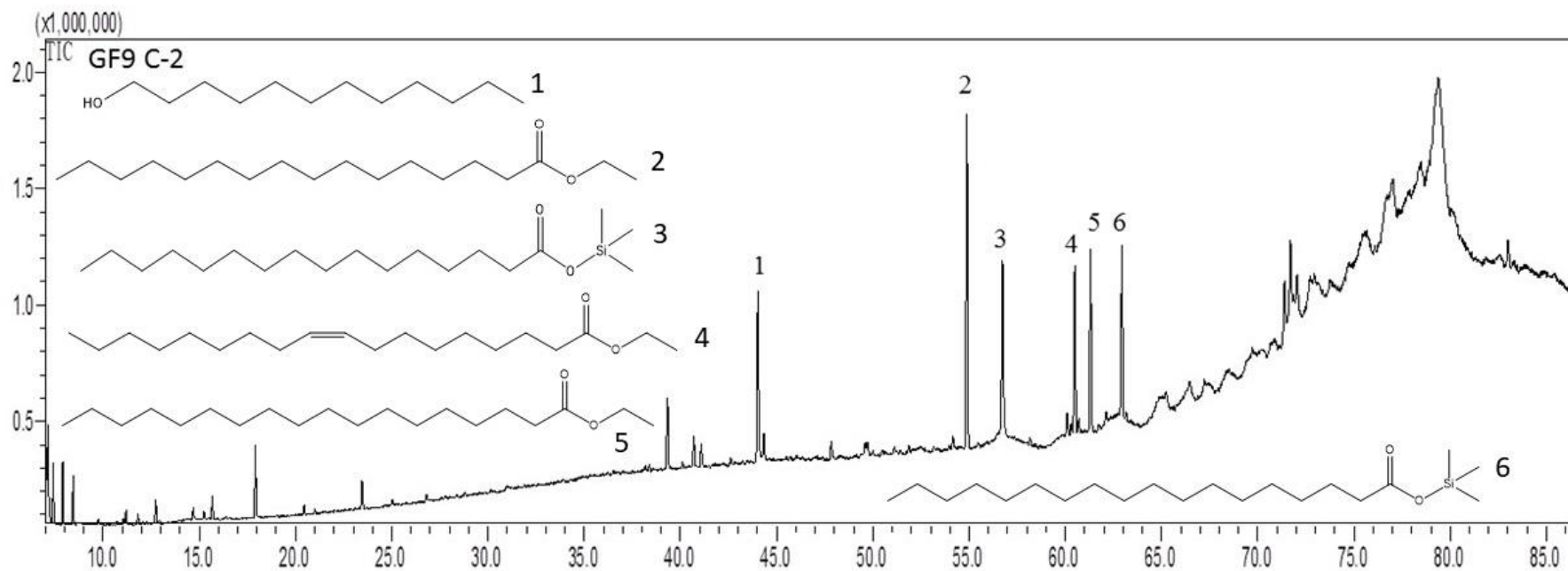


Figura 98. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF9-C2. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= 1-Dodecanol; 2 = *n*-hexadecanoato de etila; 3 = *n*-hexadecanoato de trimetilsilila; 4 = (*Z*)-9-octadecenoato de etila; 5 = Octadecanoato de etila; 6 = Octadecanoato de trimetilsilila.

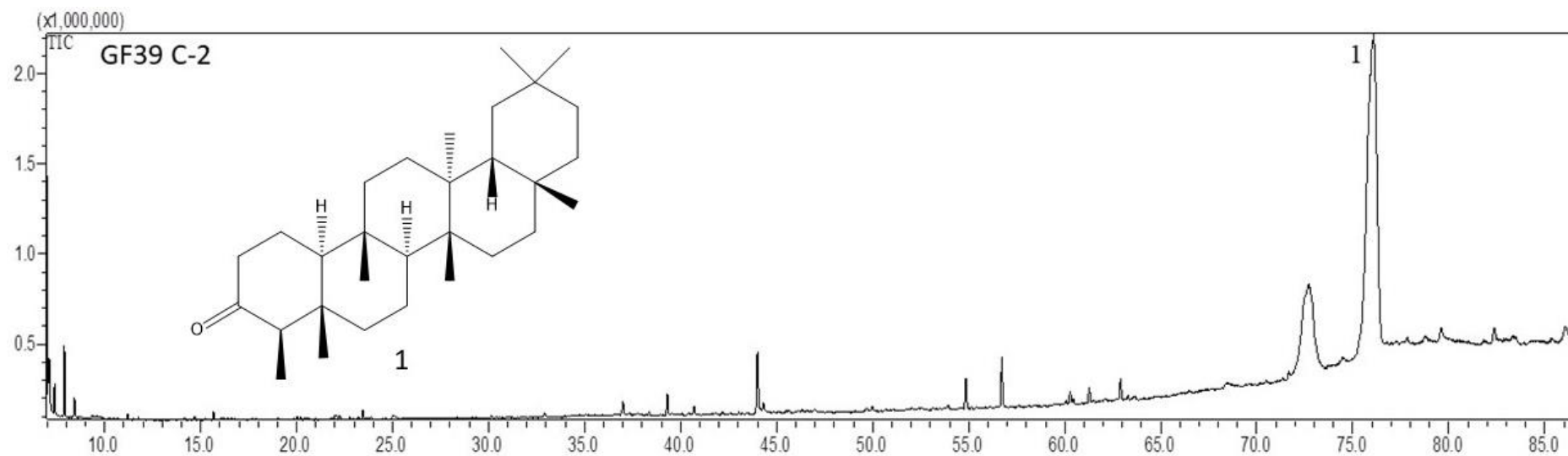


Figura 99. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF39-C2. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= Friedelan-3-ona.

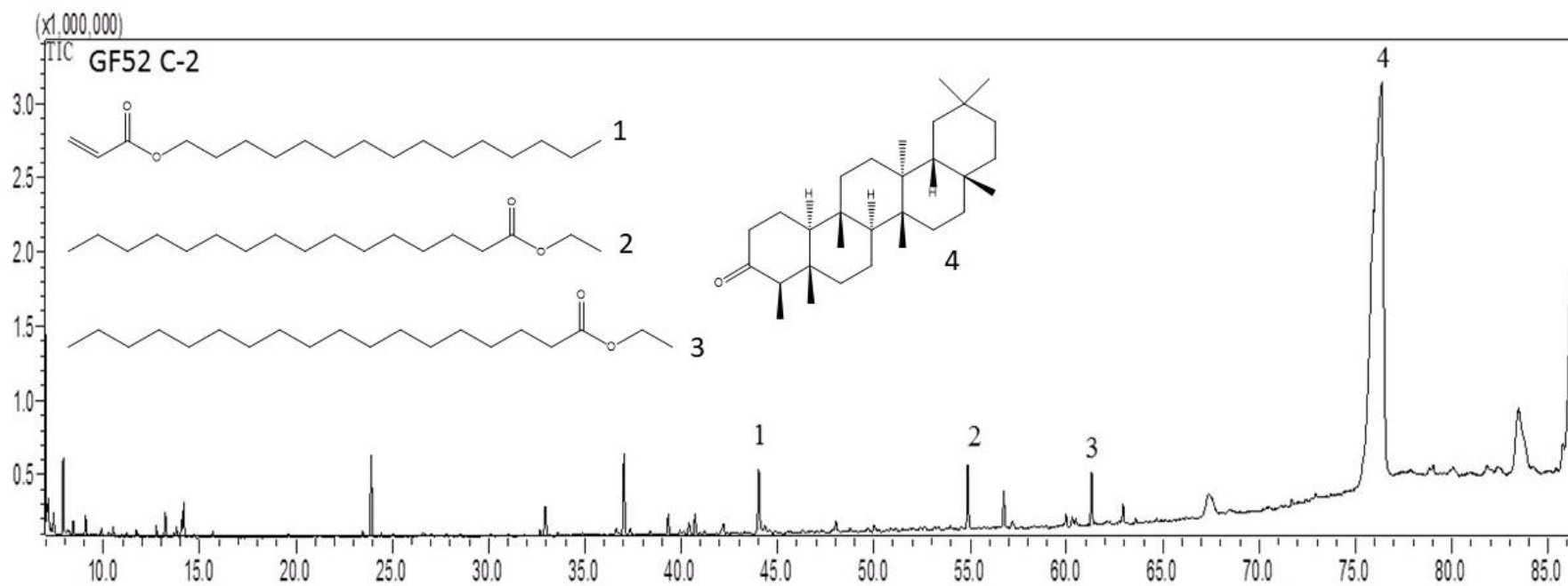


Figura 100. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF52-C2. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= Acrilato de pentadecila; 2 = *n*-hexadecanoato de etila; 3 = Octadecanoato de etila; 4 = Friedelan-3-ona.

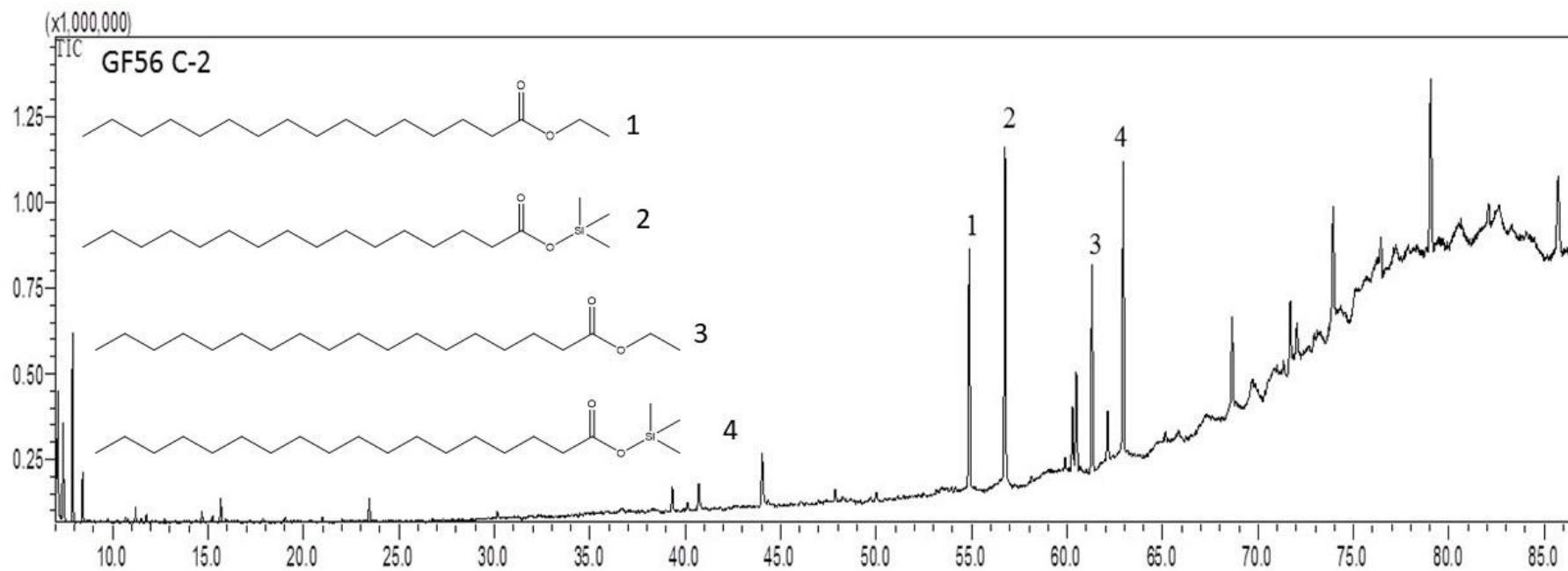


Figura 101. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF56-C2. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= *n*-hexadecanoato de etila; 2 = *n*-hexadecanoato de trimetilsilila; 3 = Octadecanoato de etila; 4 = Octadecanoato de trimetilsilila.

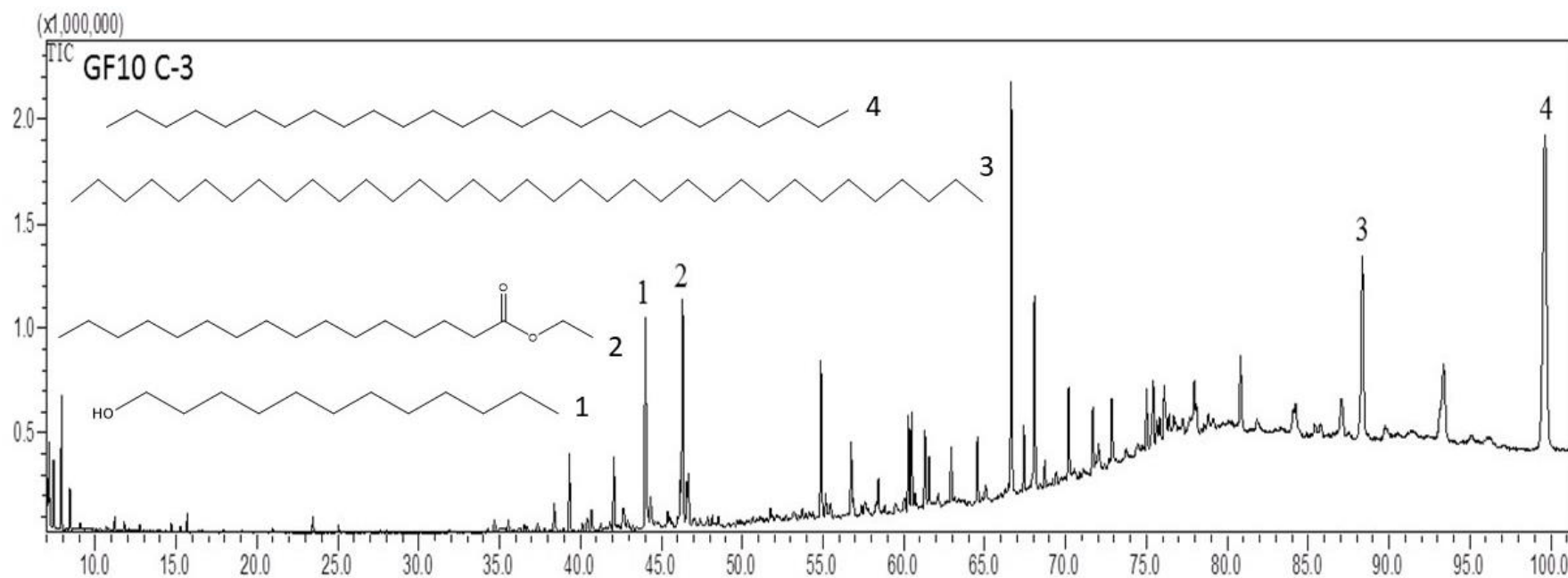


Figura 102. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF10-C3. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= 1-Dodecanol; 2 = *n*-hexadecanoato de etila; 3 = Pentatriacontano; 4 = Hexacosano.

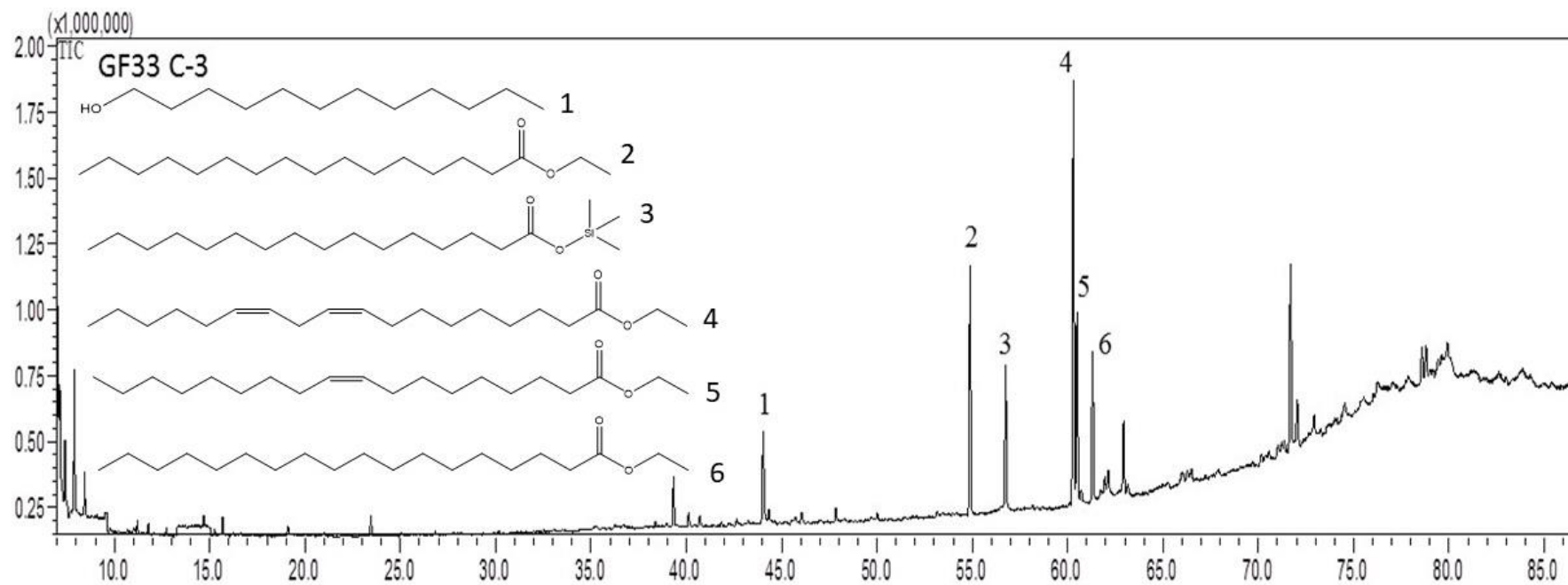


Figura 103. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF33-C3. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= 1-Dodecanol; 2 = *n*-hexadecanoato de etila; 3 = *n*-hexadecanoato de trimetilsilila; 4 = Linoleato de etila; 5 = (*Z*)-9-octadecenoato de etila; 6 = Octadecanoato de etila.

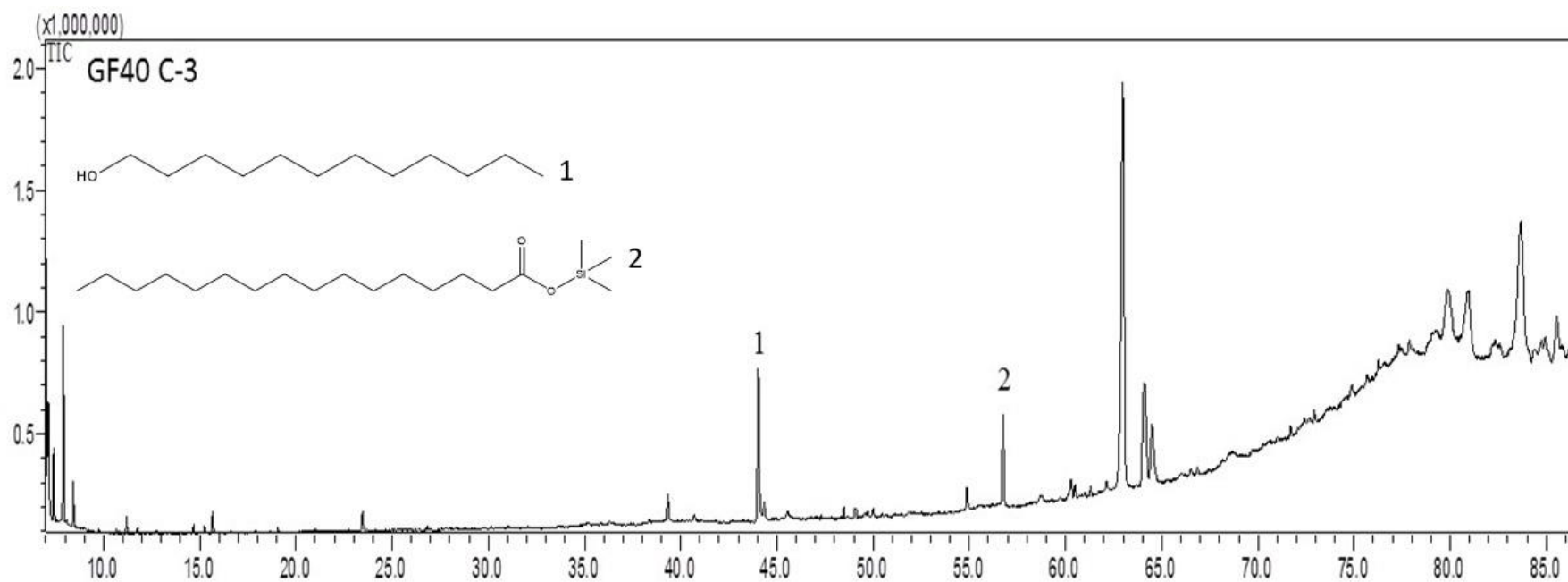


Figura 104. Cromatograma de íons totais (TIC) obtido por CG-EM de GF40-C3. Condições de análises: vide Parte Experimental, item 4.11.6. Compostos: 1= 1-Dodecanol; 2 = *n*-hexadecanoato de trimetilsilila.

APÊNDICE C – ESPECTROS DE MASSAS

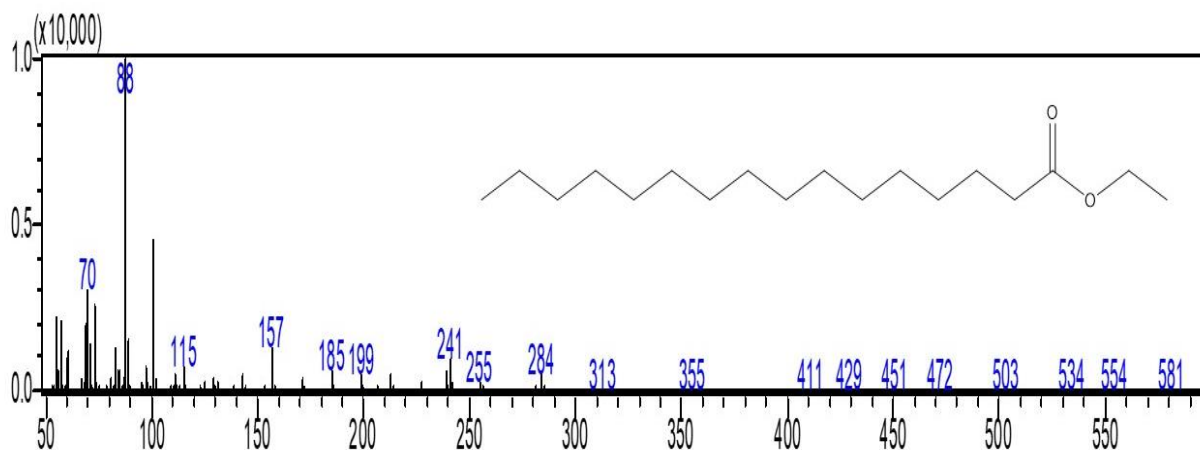


Figura 105. EM referente ao pico com TR = 54,88 min do TIC de *n*-hexadecanoato de etila. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

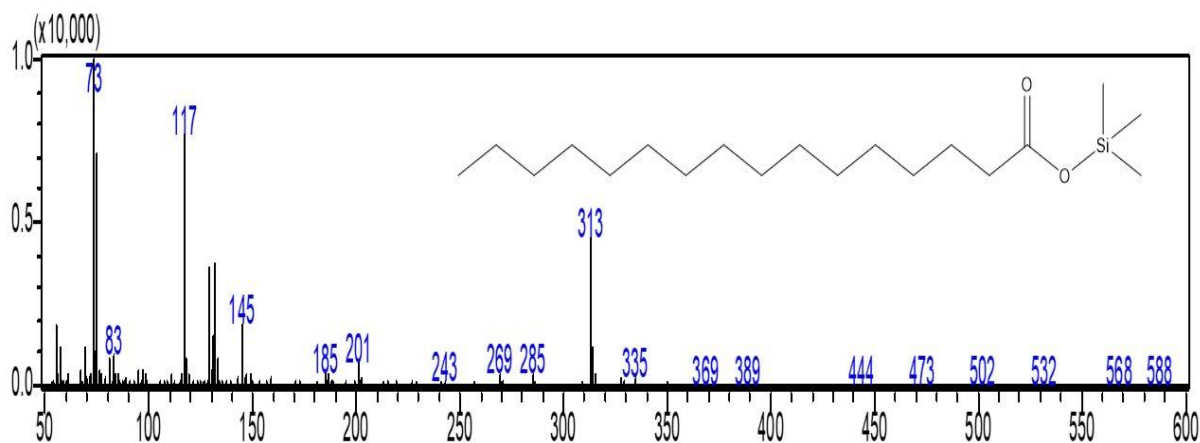


Figura 106. EM referente ao pico em TR: 56,76 min do TIC de *n*-hexadecanoato de trimetilsilila. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

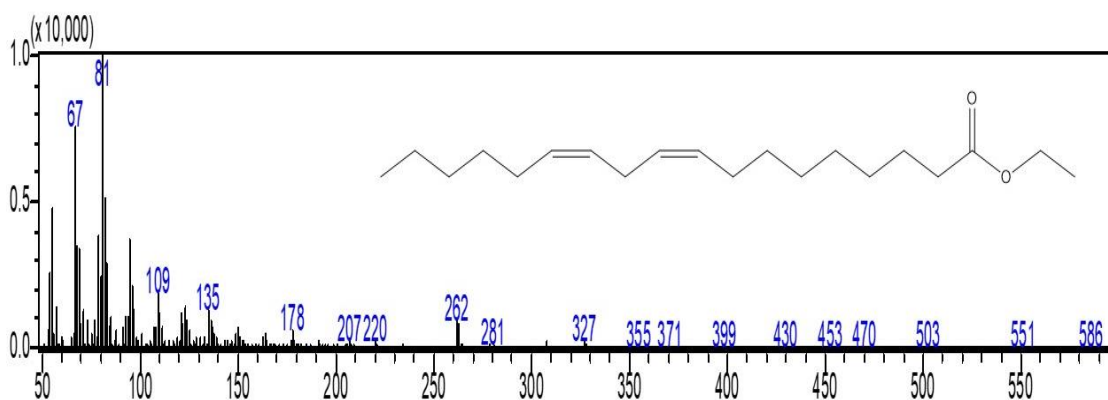


Figura 107. EM referente ao pico em TR: 60,27 min do TIC de linoleato de etila. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

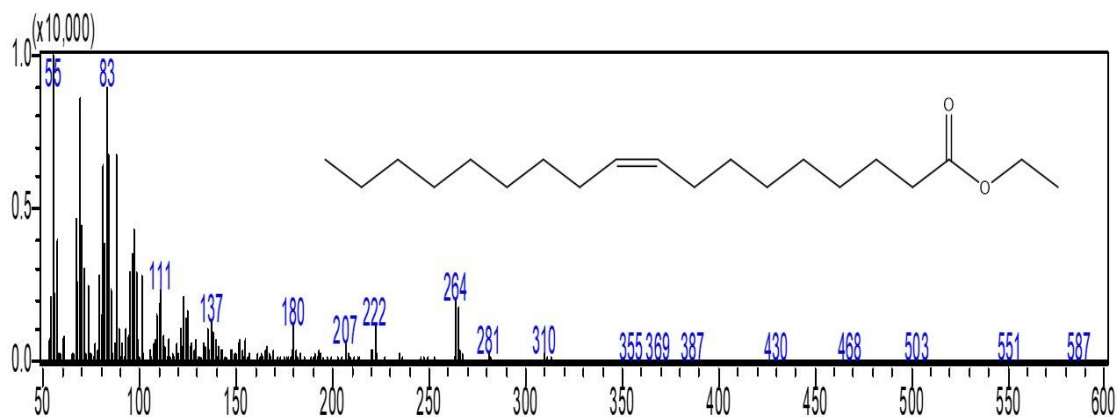


Figura 108. EM referente ao pico em TR: 61,47 min do TIC de (Z)-9-octadecenoato de etila. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

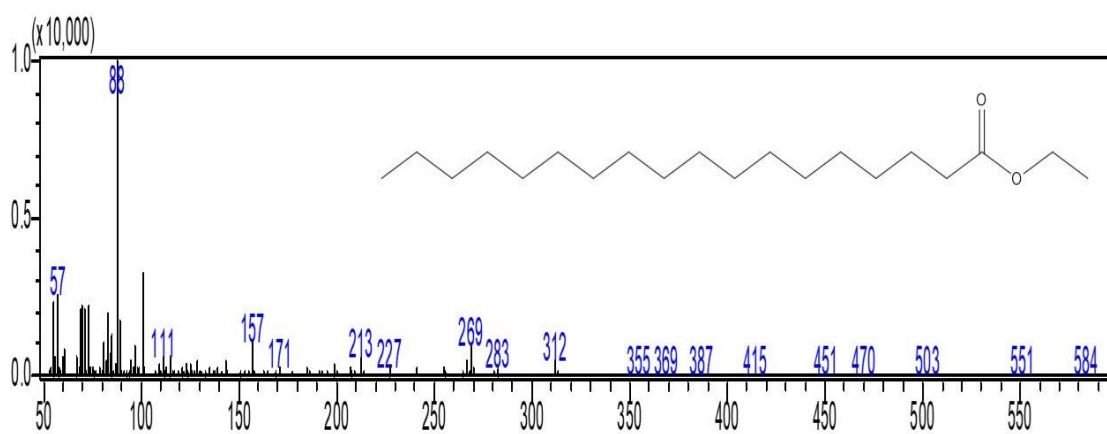


Figura 109. EM referente ao pico em TR: 61,28 min do TIC de octadecanoato de etila. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

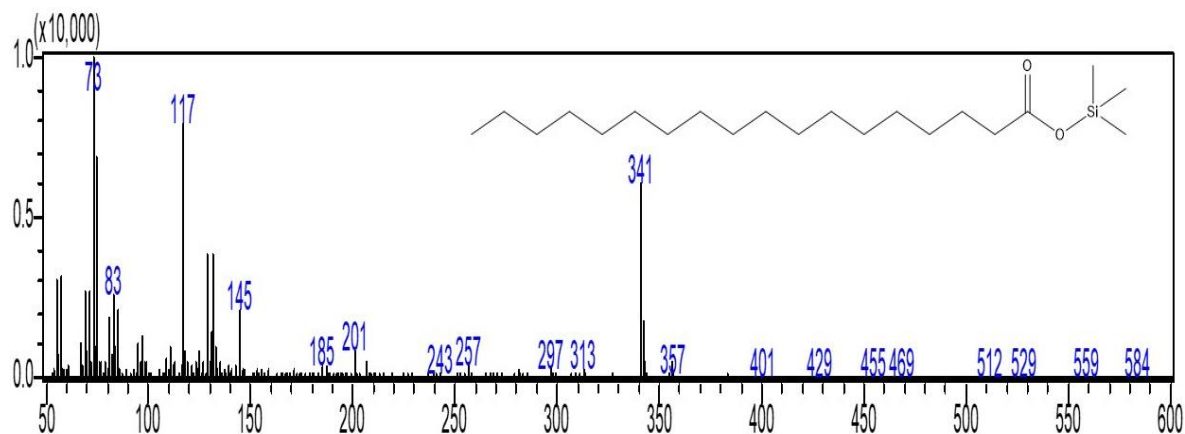


Figura 110. EM referente ao pico em TR: 62,93 min de octadecanoato de trimetilsilila. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

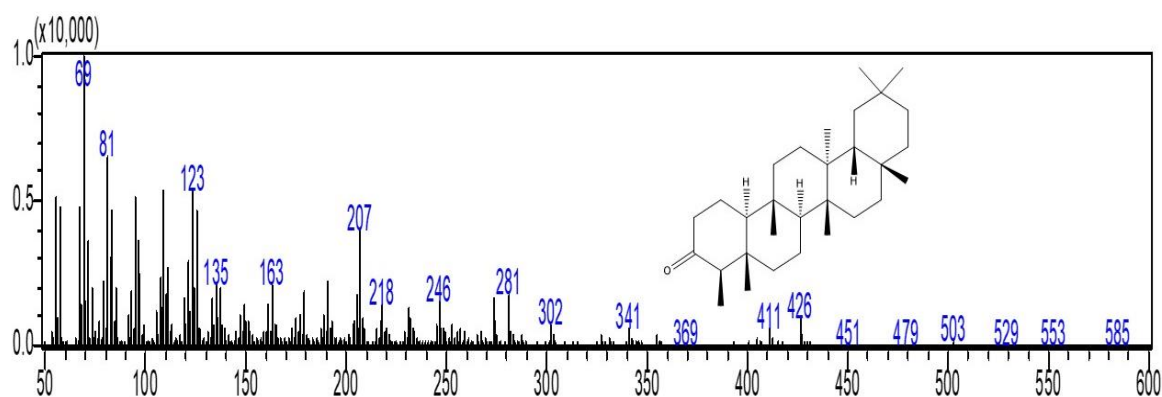


Figura 111. EM referente ao pico em TR: 76,06 min do TIC de friedelan-3-ona. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

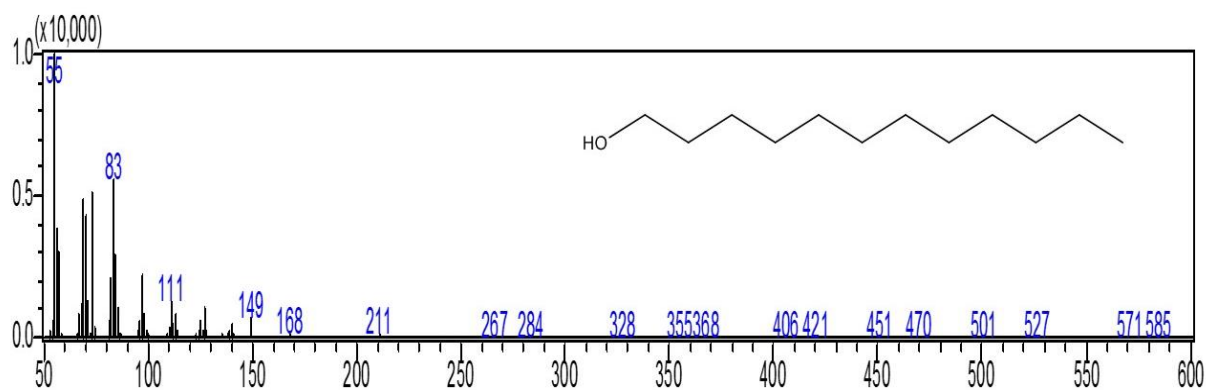


Figura 112. EM referente ao pico em TR: 44,02 min do TIC de 1-dodecanol. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

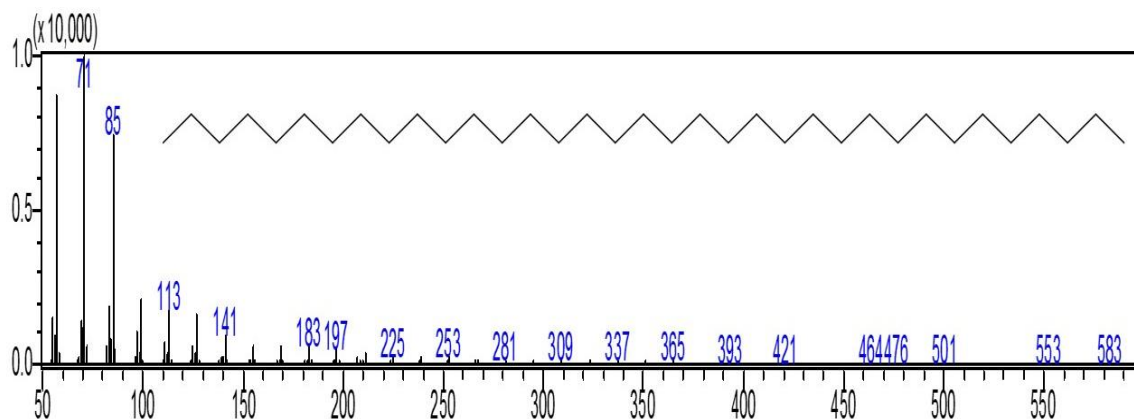


Figura 113. EM referente ao pico em TR: 88,36 min do TIC de pentatriacontano. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

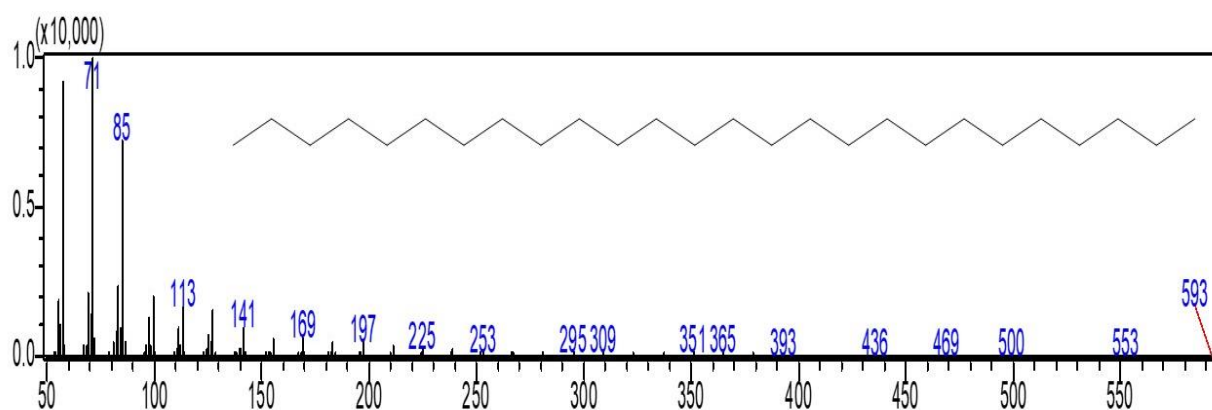


Figura 114. EM referente ao pico em TR: 99,62 min do TIC de hexacosano. Amostras que apresentavam esta substância, consultar tabelas 16, 17 e 18.

APÊNDICE D – ESPECTROS DE RMN 2D

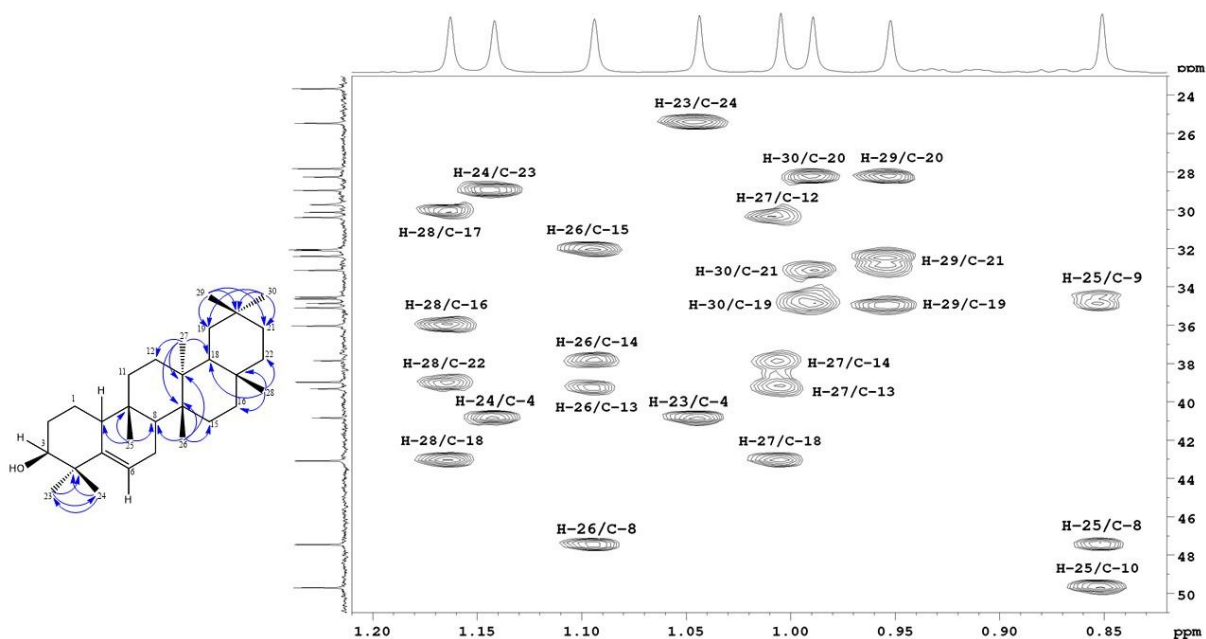


Figura 115. Expansão do mapa de contornos HMBC, correlação dos hidrogênios metílicos (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29 e H-30) para estrutura do GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

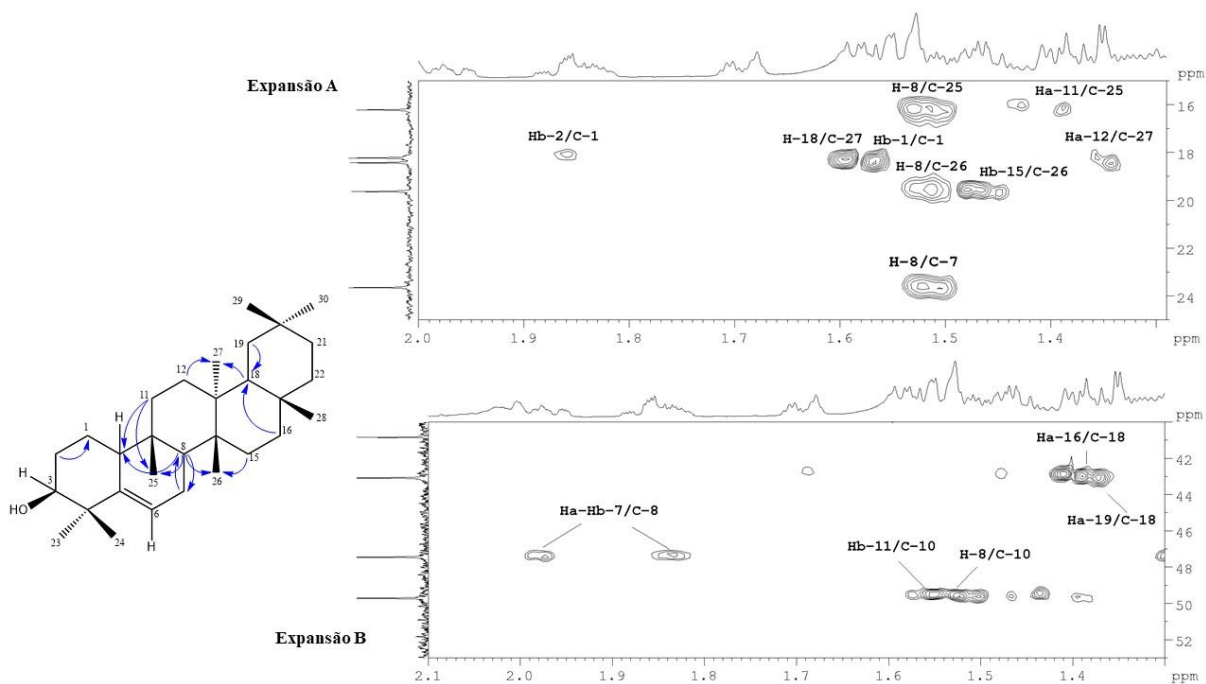


Figura 116. Expansão A e B do mapa de contornos HMBC, correlação dos hidrogênios metílicos e metínicos para estrutura do GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

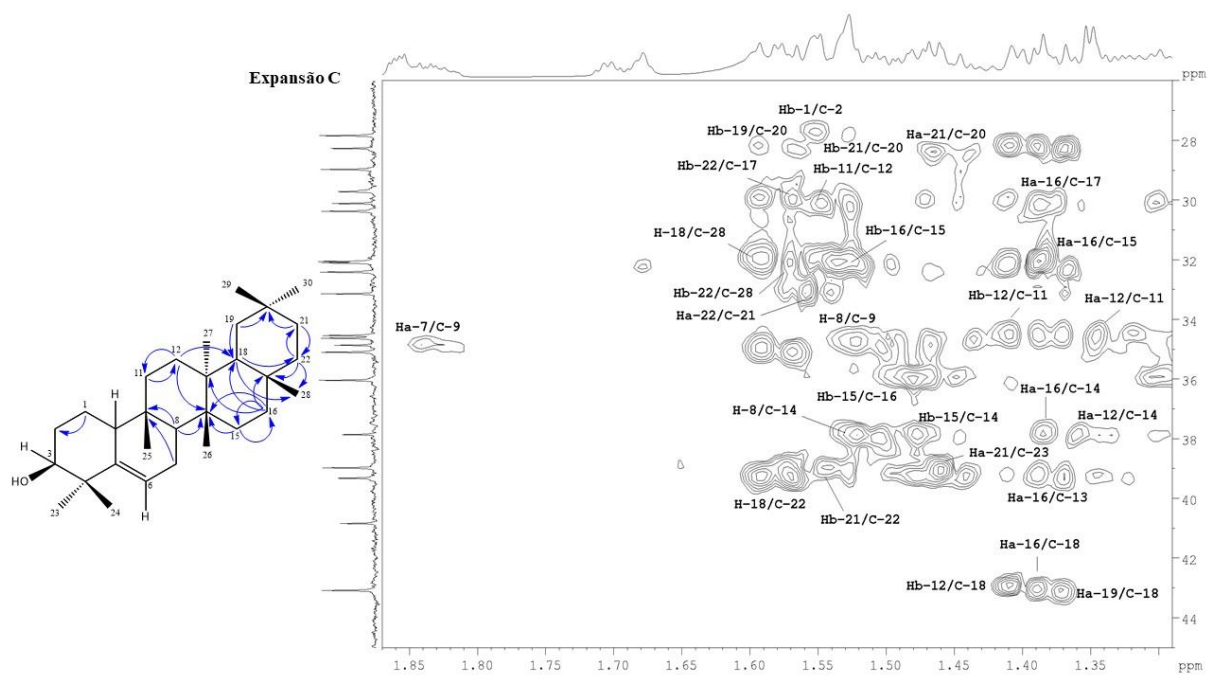


Figura 117. Expansão C do mapa de contornos HMBC, correlação dos hidrogênios metílenos e metínicos para estrutura do GF154 (CDCl_3 , 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C).

NOTA: Nomenclatura botânica do gênero *Maytenus* foi atualizado para *Monteverdia*.