



Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Farmácia

Departamento de Farmácia



Amália Luíza de Sousa da Silva

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE FLAVONOIDES PRESENTES NO EXTRATO
ETANÓLICO DE CAULES E FOLHAS DE *Luxemburgia polyandra*
(OCHNACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL FRENTE A
ARBOVÍRUS**

Ouro Preto

2025

AMÁLIA LUÍZA DE SOUSA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE FLAVONOIDES PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO DE CAULES E FOLHAS DE *Luxemburgia polyandra* (OCHNACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL FRENTE A ARBOVÍRUS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Ouro Preto como parte das exigências necessárias para a obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão

Ouro Preto

2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586c Silva, Amalia Luiza de Sousa da.
Caracterização química de flavonoides presentes no extrato etanólico de caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* (Ochnaceae) e avaliação da atividade antiviral frente a arbovírus. [manuscrito] / Amalia Luiza de Sousa da Silva. - 2025.
59 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Plantas- Análise. 2. *Luxemburgia polyandra*. 3. Flavonoides. 4. Agentes antivirais. I. Brandão, Geraldo Célio. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Amália Luíza de Sousa da Silva

Caracterização química de flavonoides presentes no extrato etanólico de caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* (Ochnaceae) e avaliação da atividade antiviral frente a arbovírus

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico Generalista

Aprovada em 29 de agosto de 2025

Membros da banca

Dr. Geraldo Célio Brandão - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis - Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Geraldo Célio Brandão, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 02/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Celio Brandao, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/09/2025, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0971803** e o código CRC **8C3E74B4**.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por me sustentar em cada passo que eu dou e iluminar meus caminhos.

A minha família, em especial aos meus pais Miguel e Lúcia, pelo apoio incondicional, pela força nos momentos difíceis, em que me ajudaram a superar os desafios e por acreditarem nos meus sonhos. A presença de vocês foi meu maior alicerce para chegar até aqui. Sou muito abençoada por tê-los na minha vida e não seria quem eu sou sem o amor que sempre recebi de vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão, pelo seu apoio inestimável e encorajamento. Sua sabedoria e a forma como tornou o complexo compreensível fizeram enorme diferença na minha trajetória acadêmica. A confiança que depositou em mim me motivou para seguir em frente. Sua paciência, experiência e orientação foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A toda equipe do laboratório LQMB onde tive a oportunidade de conhecer, conviver e aprender com pessoas maravilhosas, sempre dispostos a me auxiliar nas atividades durante a minha jornada na iniciação científica. De forma especial agradeço a Adriana Reis.

Aos meus amigos e colegas agradeço o carinho, a convivência saudável e respeitosa, as palavras de incentivo e as conversas que tornaram essa caminhada mais leve e motivadora.

Aos professores sou grata pelos ensinamentos que moldaram minha formação acadêmica e inspiraram minha busca pelo conhecimento.

RESUMO

Luxemburgia polyandra (Ochnaceae) é uma espécie endêmica do Brasil, tradicionalmente empregada na medicina popular para o tratamento de diarreias, bronquites e resfriados. O interesse científico por essa espécie tem se ampliado em função da sua composição química, uma vez que espécies do gênero *Luxemburgia* são reconhecidas pela presença de flavonoides, metabólitos secundários associados a múltiplas atividades biológicas. Os flavonoides e biflavonoides apresentam propriedades farmacológicas relevantes, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória e antiviral, o que os torna candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos. O presente estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente os constituintes do extrato etanólico de caules e folhas de *L. polyandra* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CL-EM). A análise permitiu a identificação de diferentes classes de flavonoides, incluindo monômeros e biflavonoides, evidenciando a diversidade estrutural de compostos presentes no extrato. Além da caracterização química, o extrato etanólico e frações foram submetidos a ensaios biológicos *in vitro*, sendo testada a atividade citotóxica frente as linhagens celulares Vero e MRC-5 e antiviral frente aos arbovírus Zika, Chikungunya e Mayaro. Os resultados foram promissores, sendo que o extrato etanólico apresentou atividade frente aos vírus Zika e Mayaro, com CE50 de $71,25 \pm 1,48$ e $48,90 \pm 2,52$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Adicionalmente, a fração em acetato de etila foi ativa frente aos vírus Zika, Mayaro e Chikungunya com CE50 de $25,33 \pm 3,34$, $47,07 \pm 1,85$, $12,81 \pm 6,78$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados obtidos indicam que a elevada concentração e diversidade de flavonoides e biflavonoides em *L. polyandra* podem estar diretamente associadas ao seu potencial farmacológico. Esses achados contribuem para a valorização científica da espécie e reforçam sua relevância como fonte natural de moléculas bioativas com possível aplicação no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: *Luxemburgia polyandra*; flavonoides; biflavonoides; LC-MS; atividade antiviral.

ABSTRACT

Luxemburgia polyandra (Ochnaceae) is an endemic species of Brazil, traditionally employed in popular medicine for the treatment of diarrhea, bronchitis and colds. The scientific interest in this species has expanded according to its chemical composition, since species of the genus *Luxemburgia* are recognized by the presence of flavonoids, secondary metabolites associated with multiple biological activities. Flavonoids and biflavonoids have relevant pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory and antiviral action, making them promising candidates for the development of new drugs. The aim of the present study was to chemically characterize the constituents of the ethanol extract of *L. polyandra* stems and leaves by means of high efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). The analysis allowed the identification of different classes of flavonoids, including monomers and biflavonoids, highlighting the structural diversity of compounds present in the extract. In addition to chemical characterization, the ethanol extract and fractions were subjected to *in vitro* biological tests, and cytotoxic activity was tested against the cell lineages Vero and MRC-5 and antiviral against Zika, Chikungunya and Mayaro. The results were promising, with the ethanol extract showing activity against the Zika and Mayaro viruses, with CE50 of 71.25 ± 1.48 and 48.90 ± 2.52 $\mu\text{g/ml}$ respectively. Additionally, the ethyl acetate fraction was active against the Zika, Mayaro and Chikungunya viruses with CE50 of 25.33 ± 3.34 , 47.07 ± 1.85 , 12.81 ± 6.78 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results obtained indicate that the high concentration and diversity of flavonoids and biflavonoids in *L. polyandra* may be directly associated with its pharmacological potential. These findings contribute to the scientific value of the species and strengthen its relevance as a natural source of bioactive molecules with possible application in the development of new therapeutic agents.

Keywords: *Luxemburgia polyandra*; flavonoids; biflavonoids; LC-MS; antiviral activity;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espécie vegetal Luxemburgia polyandra A.St.-Hil	18
Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonoides.....	19
Figura 3: Estrutura química da 7,7''-O-dimetilagatisflavona.....	20
Figura 4: Quercetina	22
Figura 5: Estrutura química da Genisteína.....	23
Figura 6: Estrutura química da apigenina.....	24
Figura 7- Estrutura Química da morina.....	25
Figura 8 - Orientina - 2'' - C - glicosídeo	42
Figura 9 - Figura 9: 2''-glicose-7-metoxi-orientina	42
Figura 10 - Orientina-pentosídeo	43
Figura 11 - Vitexina -2''- O - glicosídeo.....	43
Figura 12 - Vitexina	44
Figura 13 - 2''-raminose-7-metoxi-orientina.....	44
Figura 14 - 7-metoxi-orientina	45
Figura 15 - O-acetil-orientina-O-glicosídeo	45
Figura 16 - Trimetoxi - orientina - pentosil.....	46
Figura 17 - Dimetoxi - luteolina	46
Figura 18 - Dimetoxi - luteolina - C - pentosil.....	46
Figura 19 - Acetil orientina	47
Figura 20 - Diidro-ochna-flavona.....	47
Figura 21 - Amentoflavona.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas empregadas nas análises do extrato etanólico por CLAE-FR-DAD-MS.....	31
Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas nos ensaios biológicos in vitro e concentração de plaqueamentos das células para os ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral, em placas de 96 poços.....	33
Tabela 3 - Critérios utilizados durante a avaliação dos resultados dos ensaios antivirais in vitro contra os vírus Chikungunya vírus (CHIKV), Zika vírus (ZIKV) e Mayaro vírus (MAYV)	36
Tabela 4 - Resultados da análise do extrato etanólico da espécie estudada, apresentando a massa molar da substância (Daltons), o tempo de retenção (em minutos), a razão m/z (Massa/carga) do íon precursor, o erro (ppm) e o padrão de fragmentação do íon precursor	37
Tabela 5 - Atividade citotóxica (CC50), nas células Vero e MRC-5, do extrato etanólico de caules e folhas de Luxemburgia polyandra e frações enriquecidas, realizadas por meio do ensaio colorimétrico com o MTT	49
Tabela 6 - Atividade antiviral (CE50) aos vírus Zika, Chikungunya e Mayaro, na célula VERO, apresentando os respectivos índices de seletividade (IS), do extrato etanólico de caules e folhas de Luxemburgia poyandra e frações, método colorimétrico com o MTT	50

LISTA DE SIGLAS

CC ₅₀	Concentração Citotóxica média (a 50%)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDS	Cromatografia em Camada Delgada de Sílica Gel
CE ₅₀	Concentração Efetiva média (a 50%)
CHIKV	Chikungunya vírus
CLAE-FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CLAE-FR-DAD-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa acoplada Detecção por Arranjo de Diodos e a Espectro de Massas
COX-2	Ciclooxigenase-2
EM	Espectro de Massas
FDA	Food and Drug Administration
GESF	(Glomeruloesclerose Segmentar e Focal)
IS	Índice de Seletividade
MAYV	Mayaro vírus
MM	Massa Molar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADPH	(Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido)
R•	Radical livre
TR	Tempo de Retenção
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UV	Ultravioleta
ZIKV	Zika vírus
HSV-1	Herpes virus 1
HSV-2	Herpes virus 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	14
2.1 MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS	14
2.2 FAMÍLIA <i>Ochnaceae</i>	16
2.4 FLAVONOIDES	18
2.5 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	21
2.6 ARBOVIROSES	25
2.6.1 Chikungunya	25
2.6.2 Zika.....	26
2.6.3 Mayaro	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	29
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS.....	29
4.3 PERFIS CROMATOGRÁFICOS	29
4.3.1 Perfis cromatográficos por CLAE-FR	30
4.3.2 Perfis cromatográficos adquiridos através CLAE-FR-DAD-MS	30
4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	32
4.5.1 Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT	33
4.5.2 Avaliação da atividade antiviral	34

4.5.3 Determinação do Índice de Seletividade	36
4.5.4 Critérios para avaliação da atividade citotóxica e antiviral	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 ANÁLISE POR CLAE-FR-DAD-EM.....	37
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIVIRAL FRENTE AOS ARBOVÍRUS	48
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

As plantas constituem uma importante fonte de obtenção de produtos naturais bioativos, podendo muitas vezes servir como modelos para a síntese de novos fármacos. Os produtos naturais revelam em termos de estrutura uma gama imensa de substâncias com propriedades físico-químicas e biológicas variadas (WALL; WANI, 1996).

A descoberta de novos fármacos depende, fundamentalmente, da identificação de moléculas bioativas com potencial terapêutico, sendo a prospecção de produtos naturais uma estratégia relevante nesse contexto (TALLARICO e PUPO et al., 2007).

A fitoquímica tem como objetivo avaliar os constituintes químicos de espécies vegetais. Em casos em que não há registros de estudos prévios sobre determinada planta, a análise possibilita a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários. Já quando a pesquisa está voltada para uma classe específica de compostos bioativos, a investigação deve priorizar o isolamento e a caracterização estrutural dessas substâncias. (SIMÕES, 2004).

As plantas têm sido uma rica fonte de obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente. Muitas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos e o interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998; NEWMAN & CRAGG, 2020), sendo que em todas as sociedades do mundo as plantas medicinais e os medicamentos preparados à base de plantas são utilizadas para o tratamento das mais variadas doenças incluindo o câncer e a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (VIEIRA, 2008; NEWMAN & CRAGG, 2020).

A família *Ochnaceae* compreende 27 gêneros e cerca de 600 espécies, com distribuição pantropical (AMARAL, 1991 apud SALVADOR et al., 2010). No Brasil foram catalogados cerca de 13 gêneros e aproximadamente 120 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005). Várias espécies desta família botânica ocorrem na região dos Inconfidentes incluindo o Parque Estadual do Itacolomy em Ouro Preto (BRANDÃO et al., 1994).

Algumas espécies desta família botânica são empregadas na medicina popular como adstringente, contra oftalmias, diarreias, servindo também como diurético, e comumente utilizado também na forma de infusão contra a tosse, bronquite e resfriados (NASCIMENTO E MORAIS, 2017).

O gênero *Luxemburgia* é composto por 18 espécies e duas subespécies e é endêmico do Brasil. As espécies de *Luxemburgia* são encontradas em campos rupestres e afloramentos rochosos, principalmente na Cadeia do Espinhaço, no Estado de Minas Gerais. É constituído por espécies arbustivas, facilmente reconhecíveis pelas folhas de margem denteada, onde cada nervura secundária converge para uma glândula marginal, pela presença de um cílio no ápice das folhas, e pelas flores amarelas e zigomorfas (FERES, 2001).

Estudos realizados pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com as espécies *Ouratea semiserrata*, *Ouratea hexasperma*, *Luxemburgia nobilis* e *Luxemburgia octandra*, mostraram a presença de várias classes de substâncias, destacando-se aquelas substâncias que foram encontradas com maior frequência, os flavonóides e bisflavonas (BOSSO, 2004).

Flavonóides são uma classe de produtos naturais amplamente encontrados nas plantas. Além disso, são amplamente conhecidas por serem biologicamente ativos, tendo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-carcinogênicas. Pode-se destacar, dentre os diferentes tipos de moléculas pertencentes a essa classe, os C-glicosil flavonóides por apresentarem propriedades antimicrobianas, antiespasmódicas, antidiabéticas e anti-hipertensivas, além das propriedades previamente citadas (DA SILVA, DE SOUZA, DALL'OGGIO, 2011).

Patógenos emergentes e reemergentes são desafios globais para saúde pública (GAO 2018). Dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, unificada pela Portaria de Consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde. Estas três enfermidades são consideradas arboviroses transmitidas de pessoa a pessoa pelo mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que se desenvolvem em áreas tropicais e subtropicais.

O Dengue vírus e o vírus Zika pertencem ao gênero *Orthoflavivirus*, família Flaviviridae, genoma RNA, a mesma família dos vírus da encefalite, febre amarela e hepatite C. Como a maioria dos flavivírus, os vírus Dengues e Zika são transmitidos aos vertebrados por mosquitos cronicamente infectados (LAERTE, et al., 2015). Um dos principais desafios com relação a essas doenças é que não existe tratamento específico contra esses vírus (AGUIAR et al., 2024).

Biodiversidade compreende todas as formas de vida, processos ecológicos e ecossistemas hierarquicamente distribuídos nos níveis genético, ecossistemático e taxonômico. O patrimônio genético vegetal do Brasil é o maior do mundo, destacando-se a importância na descoberta de compostos com potencial bioativo (GUERRA et al., 1998).

A magnitude da biodiversidade do Brasil não é conhecida em sua totalidade devido à sua complexidade, sendo estimadas cerca de dois milhões de espécies variadas de plantas, microrganismos e animais. Estima-se que dois terços de toda biodiversidade mundial estão situados nos trópicos, e que o Brasil detenha 75% da totalidade de espécies florestais nas Florestas Amazônica e Floresta Tropical Atlântica (DIAS, 1996; GUERRA et al., 1998).

Dentro deste contexto o presente projeto propôs detectar substâncias com potencial efeito antiviral e citotóxicos da espécie *Luxemburgia polyandra*.

2 REFERENCIAL TERÓRICO

2.1 MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS

A utilização de plantas medicinais é uma das mais remotas formas terapêuticas existentes, sendo utilizada desde os povos antigos.

Segundo Silveira, Carvalho e Matos (2021):

O homem primitivo dependia exclusivamente da natureza para sua sobrevivência e a origem do conhecimento sobre o emprego de plantas como remédios baseou-se na experiência e observações cotidianas, características que constituem o saber empírico. (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2021).

Além disso, importantes tratados médicos foram escritos com base nas propriedades medicinais das plantas. Alguns exemplos são: o Charaka, descrito na Índia, desenvolvido a partir do sistema medicinal denominado Ayurveda, e o Papiro de Ebers, que foi escrito no Egito (1.550 a.C) e relata os usos do ópio extraído da papoula (*Papaver somniferum L.* - Papaveraceae) como sedativo e do óleo de rícino

(*Ricinus communis* L. - Euphorbiaceae) e de hortelã pimenta (*Mentha piperita* L. - Lamiaceae) com propriedades digestivas (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2021).

Mais tarde, Hipócrates (460-377 a.C), considerado o pai da medicina e o botânico Teofrasto (372-287 a.C) também contribuíram com os conhecimentos acerca das plantas medicinais. O primeiro, em sua obra *Corpus Hippocraticum*, contendo cerca de 70 livros, sugeriu um remédio vegetal para cada doença. E o último listou aproximadamente 450 plantas com potencial medicinal, que contribuiu para o avanço e incorporação da fitoterapia ao conhecimento médico daquela época (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2021).

O avanço científico da área química na idade contemporânea (XIX) permitiu o progresso da fitoterapia possibilitando a análise, identificação, e isolamento dos princípios ativos vegetais, que em muitos casos, passaram a ser utilizados em substituição aos extratos vegetais. Dentre os avanços que ocorreram nessa época pode-se destacar o isolamento da morfina (potente analgésico presente no ópio), da quinina (antimalárico presente na casca de *Cinchona* sp.) e da atropina (substância usada no tratamento de doenças do sistema nervoso presente na *Atropa belladonna* L. - Solanaceae) (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2021).

Ainda segundo Silveira, Carvalho e Matos (2021):

Devido ao avanço das técnicas em química orgânica no decorrer da primeira metade do século XX, houve um notável progresso na elucidação da estrutura química dos fármacos vegetais contribuindo explicitamente para o conhecimento da composição química das plantas, permitindo que muitas moléculas isoladas a partir de fontes vegetais se tornassem medicamentos (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2021).

No Brasil foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos a partir do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, objetivando garantir o acesso seguro ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos. A partir de então, o estímulo para o uso e de pesquisas e estudos sobre as plantas medicinais vem crescendo e

impulsionando o mercado de fitoterápicos no país (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2022).

Apesar da variedade e diversidade de biomas existentes em território brasileiro (Amazônia, Cerrado, Pantanal, Caatinga, Floresta Atlântica e Pampa) há muito o que explorar, como descrito no trabalho de Silveira, Carvalho e Matos (2022):

No entanto, até o momento, apenas dois fitoterápicos oriundos da flora brasileira estão disponíveis no mercado, o analgésico e anti-inflamatório Acheflan®, obtido através do óleo essencial de *Cordia verbenacea* D.C. (Boraginaceae), e o Melagrião® utilizado no tratamento de tosse e asma, desenvolvido a partir das folhas de *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae). Em 2016, a venda no Brasil desses dois fitoterápicos rendeu um total de 53,9 milhões de reais, demonstrando a importância de incentivo no desenvolvimento de fitomedicamentos de origem nacional. (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2022).

As plantas têm se destacado cada vez mais como fonte de moléculas bioativas no processo de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Nas últimas quatro décadas a FDA (Food and Drug Administration – agência norte-americana de saúde pública que regulamenta várias classes de produtos, dentre eles, os medicamentos) aprovou 1.881 novas entidades moleculares para uso terapêutico, das quais aproximadamente 23,5% são derivadas de produtos naturais. Esse dado evidencia a relevância dos produtos naturais como recurso estratégico para a inovação farmacêutica. Em comparação com moléculas sintéticas, os compostos de origem natural apresentam estruturas químicas mais complexas, elevada massa molecular, diversidade de esqueletos e propriedades químicas favoráveis, características que ampliam seu potencial para diferentes aplicações bioativas (SILVEIRA, CARVALHO, MATOS, 2022.; ESTADOS UNIDOS, 2025).

2.2 FAMÍLIA Ochnaceae

A família Ochnaceae compreende 27 gêneros e cerca de 600 espécies, com distribuição pantropical (AMARAL, 1991 apud SALVADOR et al., 2010). No Brasil

foram catalogados cerca de 13 gêneros e aproximadamente 120 espécies (SOUZA & LORENZI, 2005). Várias espécies desta família botânica ocorrem na região dos Inconfidentes incluindo o Parque Estadual do Itacolomy em Ouro Preto. As plantas desta família são essencialmente arbóreas ou arbustivas, menos frequentemente herbáceas (*Sauvagesia*). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa tem mostrado o potencial das espécies desta família como fonte de substâncias com atividade antiviral (BRANDÃO et al., 2011; FERREIRA et al., 2021).

Os trabalhos de isolamento e purificação de metabólitos secundários provenientes de espécies de Ochnaceae têm levado, até o presente momento, à identificação e elucidação estrutural de flavonoides e biflavonoides. (MOREIRA et al., 1994, MBING et al., 2003a, 2003b, SUZART et al., 2007; CARVALHO et al., 2008). Grande parte das pesquisas envolve espécies dos gêneros *Ouratea*, *Luxemburgia*, *Ochna* e *Lophira*. A variedade estrutural de biflavonoides e flavonoides frequentemente observada nessas espécies possibilita sua aplicação como marcadores quimiotaxonômicos. (TIH et al., 1989 e 1992; LIKHITWITAYAWUID 2001; MESSANGA et al., 2002; MBING et al., 2006).

Nesse contexto, faz-se importante conhecer, quimicamente, quais as moléculas que estão presentes na planta. A realização desta caracterização pode refletir positivamente no desenvolvimento de novos fármacos e, conseqüentemente, na melhora da qualidade de vida das pessoas (SUZART et al., 2007).

A figura 1 mostra a espécie vegetal *Luxemburgia polyandra* A.St.-Hil., utilizada neste trabalho.

Figura 1: Espécie vegetal *Luxemburgia polyandra* A.St.-Hil



Fonte: Brasil Holístico | BRAH.

O gênero *Luxemburgia* é endêmico do Brasil, compreende 20 espécies distribuídas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FLORA DO BRASIL 2020) e são encontradas em campos rupestres e afloramentos rochosos, principalmente na Cadeia do Espinhaço (FERES, 2001).

A espécie *Luxemburgia nobilis* apresenta uma grande diversidade flavonoidica, além de serem ativas biologicamente. Descreve-se a presença de amentoflavona (apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante), robustaflavona (apresenta atividade anti-inflamatória), epicatequina (apresenta propriedades anti hipertensivas), dentre outros (SUZART et al., 2007; LI et al., 2020; JO et al., 2019; KLUKNAVSKY et al., 2020).

A variedade de moléculas biologicamente ativas e com potencial farmacológico, com destaque para os flavonoides, existentes nas plantas da família *Ochnaceae* e do gênero *Luxemburgia* explica o grande interesse em se estudar e caracterizar quimicamente extratos de diferentes espécies desta família (SUZART et al., 2007). Além disso, ainda não há publicações sobre a espécie estudada nesse trabalho descritas na literatura.

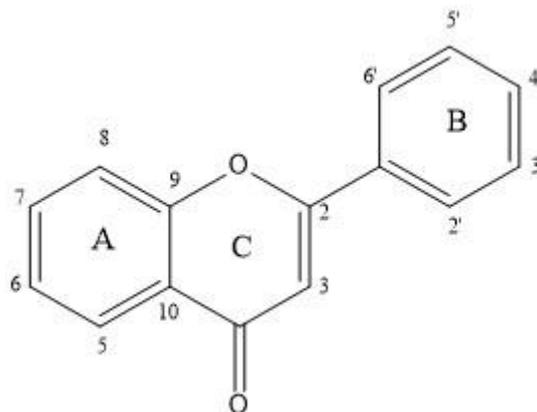
2.4 FLAVONOIDES

Flavonóides são uma grande classe de compostos naturais aromáticos reportados como os compostos fenólicos mais comuns em plantas. Através dos anos, os flavonóides têm representado uma grande porcentagem de fitoquímicos de origem natural, sendo que mais de 10.000 classes diferentes de flavonoides foram encontradas no Reino Plantae (EKALU, HABILA, 2020).

Uma substância “fenólica ou polifenólica” é aquela que possui um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais (ésteres, éteres, glicosídeos e outros) (SIMÕES et al., 2017).

Na natureza podem-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais. Quimicamente, a maioria dos flavonoides baseia-se em uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por de 15 átomos de carbono constituído por dois anéis de benzeno (A e B como mostrado na Figura 2), ligado por meio de uma cadeia três carbonos entre elas e um oxigênio como heteroátomo (C) (SIMÕES et al., 2007). Essa estrutura básica pode ser observada na figura 2.

Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonoides

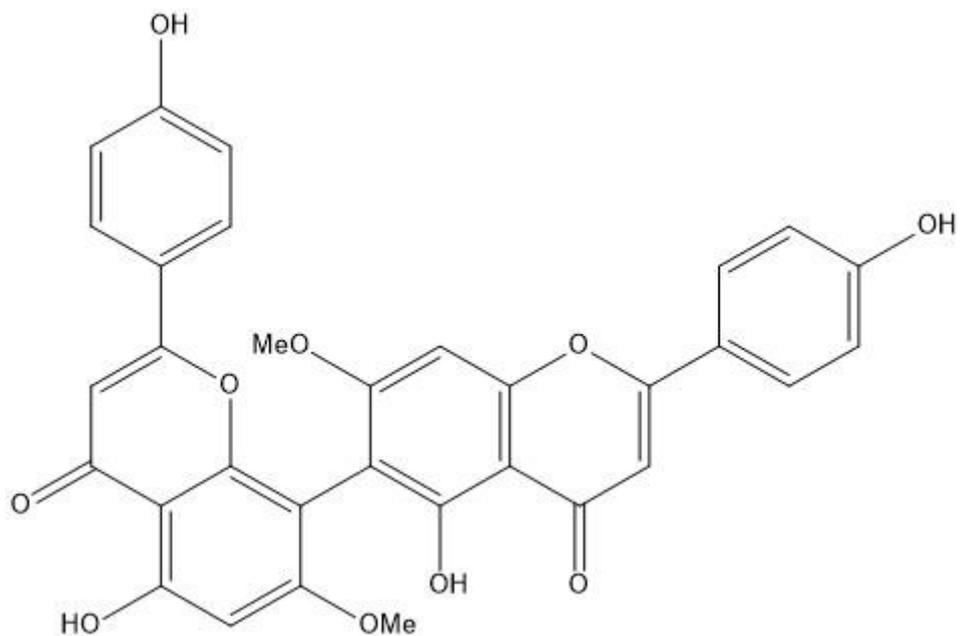


As propriedades biológicas e oxidativas dos flavonóides são responsáveis pela sua capacidade anti-alérgica, cardioprotetora, antidiabética, anti-inflamatória e antioxidante. Pesquisas recentes têm focado nos benefícios para a saúde destes metabólitos secundários por ter ação preventiva contra doenças. Além destas já mencionadas, foram relatadas propriedades quelantes, bem como sua utilização como substâncias antienvhecimento, moduladores da permeabilidade capilar e da resposta inflamatória, antibacteriana e terapêutica, gastroprotetora e antidiabética destes compostos. (EKALU, HABILA, 2020).

Um exemplo é a biflavona 7,7''-O-dimetilagatisflavona, estrutura química representada na figura 3, isoladas de *O. spectabilis*, demonstraram capacidade de

inibir a enzima aldose redutase presente no cristalino bovino. O excesso de atividade dessa enzima está associado ao desenvolvimento de diversas complicações da diabetes, incluindo catarata, retinopatia e neuropatia (SUZART et al., 2007). A figura mostra a estrutura química dessa substância:

Figura 3: Estrutura química da 7,7''-O-dimetilagatisflavona



Fonte: SUZART et al., 2007

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido a sua origem biogenética comum. A maioria dos biflavonóides de ocorrência natural são dímeros de flavonas e flavononas – raramente chalconas – apresentando substituintes nas posições dos carbonos 5, 7 e 4' e, mais raramente, 5, 7, 3' e 4' (SIMÕES et al., 2004).

Os biflavonoides encontram-se amplamente distribuídos em diferentes espécies vegetais, sendo detectados em diversos tecidos das plantas. Apesar de sua ocorrência expressiva, suas funções biológicas ainda não se encontram plenamente elucidadas. Entre os papéis sugeridos, destacam-se a atuação como agentes antifúngicos e como substâncias deterrentes à herbivoria por insetos, além da possível

função fotoprotetora frente à radiação ultravioleta nas folhas. No âmbito farmacológico, têm sido atribuídas a esses compostos atividades relevantes, incluindo efeitos cardiotônicos, propriedades anti-inflamatórias, entre outras ações de interesse terapêutico (SIMÕES et al., 2004).

2.5 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Segundo Simões et al. 2004,

O interesse econômico pelos flavonóides é decorrente de suas propriedades, como, por exemplo, o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmentos, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau e por conferirem cor e valor nutricional para alguns alimentos. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, resultado de algumas propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras. (SIMÕES et al., 2007)

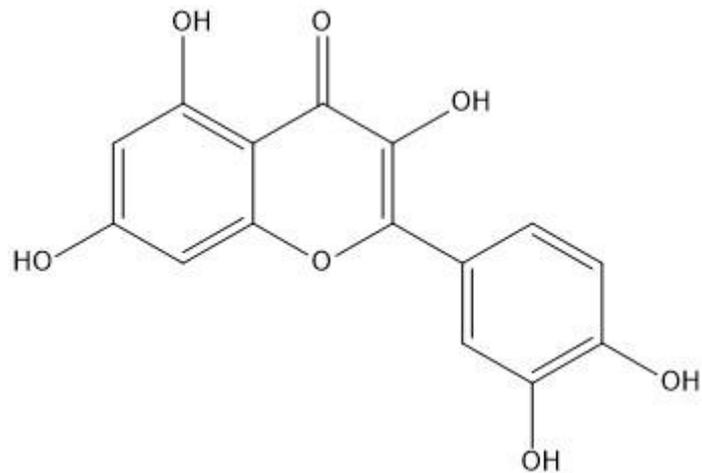
- Atividade Antiviral

Carvalho et al (2013) demonstraram em ensaios in vitro a atividade virucida da quercetina sobre o parvovírus canino. Para avaliação do efeito antiviral, a redução do título viral foi de 93% para concentração de 3 micrograma/ml de quercetina incubada com vírus. No mesmo estudo, foi observada também a redução do título viral na dose dependente na concentração de 1,5 micrograma/ml em testes de determinação de atividade sobre a células (CARVALHO et al, 2013).

Para investigar o mecanismo pelo qual a quercetina interage na inibição do ciclo da replicação do parvovírus canino, Carvalho et al (2013) demonstraram em teste inibitórios da adição de quercetina sobre diferentes etapas do ciclo replicativo do parvovírus, a redução de 90% do título viral na etapa de penetração, porém não teve redução significativa do título viral nas etapas de adsorção e pós-infecção. Tais resultados revelam a potencial atuação da quercetina ao interferir na ligação do vírus à célula hospedeira, dificultando a infecção pelo parvovírus canino aumentando a capacidade de seus efeitos antivirais (CARVALHO et al, 2013).

A seguir se encontra a estrutura química da quercetina, na figura 4.

Figura 4: Quercetina



- Atividade Antioxidante

Os flavonoides apresentam atividade antioxidante devido à sua capacidade de quelar metais, neutralizar radicais livres — incluindo o radical hidroxila e radicais peróxido — e eliminar espécies oxidantes como o ânion superóxido (O_2^-), além de atuarem de forma sinérgica com outros antioxidantes, como as vitaminas C e E. Pesquisas atuais investigam a relação entre a estrutura dos flavonoides e sua ação antioxidante. Essa atividade também envolve a inibição de enzimas como ciclo-oxigenase, lipoxigenase, NADPH oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, assim como a estimulação de enzimas antioxidantes, incluindo catalase e superóxido dismutase. (TRUEBA; SÁNCHEZ, 2001).

Observa-se a ação antioxidante dos flavonoides analisando as seguintes equações:



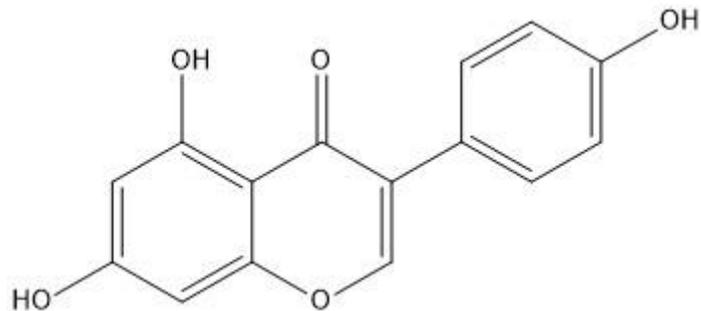
As variações na atividade antioxidante dos flavonoides, decorrentes de polihidroxilação ou polimetoxilação, provavelmente se devem às diferenças estruturais dos radicais livres. Quando os flavonoides doam radicais H ou grupos

metila, esses radicais livres tornam-se menos reativos e, assim, não conseguem mais atacar as biomoléculas do organismo (BIRT et al, 2001).

Um exemplo é a genisteína, um isoflavonoide, apresentou efeito fotoprotetor e ação na prevenção da fotocarcinogênese cutânea em modelos animais. Esse efeito está relacionado à diminuição das espécies reativas de oxigênio (EROs) – ou seja relaciona-se com sua atividade antioxidante, uma vez que reduz a infiltração de linfócitos nas regiões expostas à radiação ultravioleta (UV) (Bosch et al., 2015).

A estrutura química da genisteína está representada na figura 5.

Figura 5: Estrutura química da Genisteína

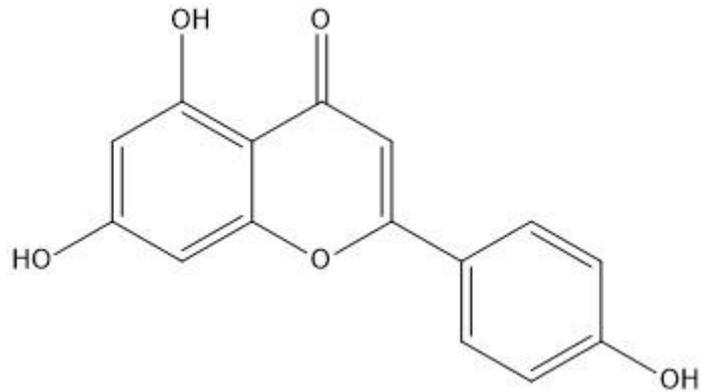


- Atividade Anti-inflamatória

Os flavonoides apresentam potencial anti-inflamatório, principalmente por interferirem na biossíntese dos eicosanoides. O mecanismo pelo qual os flavonoides inibem as enzimas ciclo-oxigenase e lipoxigenase tem sido amplamente estudado. Compostos como a quercetina e a apigenina demonstraram efeito anti-inflamatório ao inibir a COX-2 e a óxido nítrico sintase (MUTOH et al., 2000).

Um exemplo de flavonoide com essa atividade é a apigenina, cuja estrutura química está representada na figura 6.

Figura 6: Estrutura química da apigenina



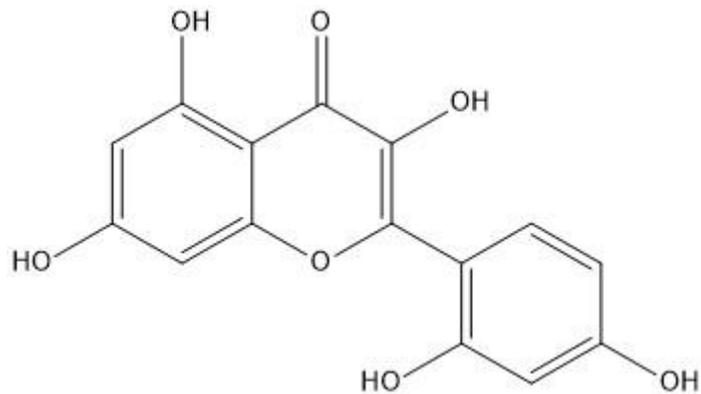
- Atividade Antitumoral

Os flavonoides vêm sendo descritos como agentes capazes de inibir células cancerosas, em razão de suas propriedades farmacológicas antioxidantes. Dessa forma, podem contribuir para o controle da proliferação celular e atuar na prevenção da oncogênese por meio da modulação de enzimas envolvidas nas vias metabólicas relacionadas ao desenvolvimento do câncer. (AMADO et al., 2011; HUNG et al., 2009. Assim, a ação antitumoral de flavonoides e polifenóis tem sido amplamente investigada, buscando-se compreender como esses compostos participam na inibição da multiplicação celular, especialmente por meio da indução de apoptose em diferentes linhagens de células cancerígenas. (JADVAR, 2009).

No estudo conduzido por Pereira et al. (2015), foi analisado o potencial da morina, um flavonoide, na indução de apoptose em linhagens de células de câncer de pulmão (H4600). Os resultados demonstraram redução do crescimento tumoral e indução de morte celular quando tratadas com a concentração de 800 µg/mL. A avaliação foi realizada por meio dos ensaios de MTT, microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (PEREIRA et al., 2015).

A estrutura química da morina está representada na figura 7.

Figura 7- Estrutura Química da morina



2.6 ARBOVIROSES

As arboviroses são doenças causadas por vírus e transmitidas aos humanos através de mosquitos hematófagos infectados, sendo que os principais gêneros desses insetos são *Aedes* e *Culex*. Essas enfermidades podem causar diferentes sintomas, variando de uma febre leve até quadros de saúde mais sérios, sendo alguns deles potencialmente fatais. (Brasil 2025).

São doenças de grande importância em saúde pública devido a fatores como o grande potencial endêmico apresentado por elas, a dificuldade no controle dos vetores e a inexistência de vacinas e tratamentos específicos e efetivos contra esses vírus. (PEPE et al., 2020). As principais são Chikungunya, Zika e Febre Mayaro. Além disso, o Brasil, situado em região tropical, reúne fatores ambientais favoráveis à presença de vetores, como os mosquitos, e à circulação de arboviroses. (LOPES et al., 2014).

2.6.1 Alphavírus chikungunya

O Alphavirus Chikungunya é um vírus pertence ao gênero *Alphavirus* e é transmitido por fêmeas de mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (AGUIAR et al., 2024).

Descrito pela primeira vez em 1952, na Tanzânia, após ter sido confundido com a dengue, o vírus passou a ser detectado em diferentes países da África e da Ásia.

No Brasil, sua ocorrência foi relatada apenas no final de 2013 (DONALISIO et al, 2017). Há um número significativo de casos a cada ano e surtos frequentes mundialmente (AGUIAR et al., 2024).

A doença pode se manifestar de forma leve e não causar complicações, mas possui muitos sintomas parecidos com a dengue, tais como quadros de febre, dor articular intensa, cefaleia e mialgia. Além disso, pode ocorrer o desenvolvimento artrite crônica que pode durar vários meses ou anos. (AGUIAR et al., 2024; DONALISIO et al., 2015; RIBEIRO ET AL., 2018).

Até o presente momento, não há tratamento antiviral específico para essa arbovirose. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2025). Na ausência de uma medicação antiviral específica, o tratamento da chikungunya tem como objetivo principal o alívio sintomático, especialmente da dor. Para algumas complicações renais, como a GESF (Glomeruloesclerose Segmentar e Focal) ou a microangiopatia trombótica, têm sido propostos tratamentos com corticosteroides e imunossupressores. Contudo, até o momento, não existem evidências consistentes que comprovem a eficácia dessas intervenções na doença (AGUIAR et al., 2024).

2.6.2 Orthoflavivirus zikaense

O Orthoflavivirus zikaense (ZIKV) é responsável por uma arbovirose, isto é, uma enfermidade viral transmitida por mosquitos hematófagos, em especial as fêmeas. O primeiro registro do ZIKV ocorreu em 1947, em macacos da floresta Zika, localizada em Kampala, Uganda (DICK, KITCHEN E HADDOW, 1952).

O ZIKV pode estar relacionado ao desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré (GBS), enfermidade neurológica que ocorre predominantemente em indivíduos adultos com mais de 30 anos. Trata-se de uma doença autoimune que provoca alterações motoras e que, em determinadas situações, pode evoluir para perda

sensorial envolvendo músculos respiratórios e faciais (CRÉANGE, 2016; GOODFELLOW e WILLISON, 2016).

Até o presente momento, não há medicamentos aprovados para uso clínico no tratamento da infecção pelo ZIKV, limitando-se as intervenções ao controle dos sintomas. Nas últimas décadas, observa-se um crescente interesse científico na investigação de produtos naturais derivados de plantas, visando isolar e caracterizar substâncias com potencial ação antiviral, especialmente contra o ZIKV e o vírus da dengue, fundamentando-se em práticas da medicina tradicional (BARROWS et al., 2016; KADIR et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014).

2.6.3 Alphavirus mayaro

Desde 1954, o Alphavirus mayaro (MAYV) tem sido identificado em diferentes países das Américas, com destaque para a América do Sul e Central, onde surtos e casos esporádicos são notificados. Observa-se que alguns desses episódios estão relacionados a estações chuvosas, que favorecem tanto o aumento da população de vetores quanto a manutenção do ciclo de transmissão (Mourão et al., 2012).

No período de 2014 a 2016, foram notificados no Brasil 343 casos suspeitos de MAYV, com 70 confirmações mediante diagnóstico laboratorial. Em 2019, conforme dados do Ministério da Saúde referentes às semanas epidemiológicas 28 a 32, houve a confirmação de cinco casos no estado do Pará, dois em crianças, das quais uma precisou de internação hospitalar (Barros et al., 2021).

A manifestação clínica da doença apresenta semelhança com arboviroses como dengue, chikungunya e zika, caracterizando-se por febre, mialgias, dor retro-ocular, tontura, cefaleia, artralgias e edema articular, frequentemente incapacitante. O curso é autolimitado, geralmente entre três e sete dias; contudo, as artralgias podem se prolongar por semanas ou até meses (Brito, Fernandes e Farias, 2021).

Não há terapias antivirais específicas disponíveis contra o Alphavirus Mayaro; o manejo clínico baseia-se no tratamento sintomático, principalmente com o emprego de fármacos analgésicos para controle da dor (OMS, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização química do extrato etanólico de caules e folhas da espécie *Luxemburgia polyandra*. Adicionalmente, realizar o estudo do efeito antiviral desse extrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o fracionamento inicial do extrato etanólicos com solventes de polaridade crescente.

Caracterizar o extrato etanólico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-FR-DAD-EM).

Avaliar a atividade citotóxica do extrato etanólico de caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* e frações obtidas a partir dele frente a linhagens celulares Vero e MRC-5.

Avaliar a atividade antiviral do extrato e frações frente aos vírus Zika, Chikungunya e Mayaro por método colorimétrico utilizando o MTT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na caracterização fitoquímica será utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa acoplada à detecção UV (arranjo de diodos) e à Espectrometria de Massas (EM). Como resultados do presente estudo espera-se identificar substâncias químicas presentes no extrato etanólico de caules e folhas da *Luxemburgia polyandra*, que possam tornar potenciais fontes de substâncias com potencial farmacológico.

4.1 MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado no município de ouro preto, minas gerais.

A exsicata foi identificada e depositada no herbário José Badini UFOP (Ouro Preto). O projeto foi cadastrado no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado sob o n° ab3154f.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Os caules e folhas foram secos em estufa ventilada, a 40°C, moídos e o pó acondicionado em frascos de vidro. Posteriormente, os extratos foram preparados utilizando etanol 96° e as soluções resultantes da extração foram concentradas por destilação em evaporador rotatório.

4.3 PERFIS CROMATOGRÁFICOS

A técnica utilizada para produzir o perfil cromatográfico neste estudo foi a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa acoplada a espectro de massas (CLAE–FR).

4.3.1 Perfis cromatográficos por CLAE-FR

Cerca de 10 mg dos extratos foram utilizados para estabelecer os perfis cromatográficos por CLAE-FR. Uma quantidade de 10 mg dos extratos foi colocada em tubo de microcentrífuga, acrescentou-se 1 ml de metanol grau CLAE, sendo a dissolução realizada por ultra-som, por 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi utilizado para as análises por CLAE-FR.

Os perfis cromatográficos foram obtidos através de uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 250 x 4 mm d.i.), detecção UV 220-400 nm, fluxo de 1 mL/min e com o forno da coluna a 40°C.

A matriz oriunda de extratos vegetais é complexa e por isso, foi empregado um gradiente de MeCN - H₂O, com um período de eluição linear longo (5 - 95% de MeCN, em 65 minutos) seguido de um período de eluição isocrática curto (95% de MeCN por 5 minutos). Houve um intervalo de 5 minutos após cada corrida do programa de eluição e antes da injeção de nova amostra, para retornar às condições iniciais do gradiente.

Em todas as etapas, os solventes utilizados foram de grau CLAE (Tedia Brasil®) e água purificada (sistema Milli-Q).

4.3.2 Perfis cromatográficos adquiridos através de CLAE-FR-DAD-MS

As análises por LC-MS/MS foram feitas empregando um sistema Nexera UHPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (maXis ETD high-resolution ESI-QTOF (Bruker)) tendo como programa de controle Compass 1.7 (Bruker). Utilizou-se uma coluna Shimadzu Shim-Pack XR-ODS-III (C18, 2.2µm, 2.0 x 150mm) com uma temperatura do forno de 40°C e fluxo da fase móvel de 400 µl/min. Os componentes da fase móvel utilizadas foram A (Água Milli-Q®

acidificada a 0,1% de ácido fórmico) e B (Acetonitrila) a programação utilizada para eluição foi um gradiente inicial contendo 5% de B por 0,5 minutos e em seguida um gradiente linear até 100% de acetonitrila no tempo de 40 minutos, após o gradiente de 100% ser atingido prosseguiu-se com o mesmo gradiente por 5,0 minutos.

Tabela 1 - Condições cromatográficas empregadas nas análises do extrato etanólico por CLAE-FR-DAD-MS

TEMPO (min)	H ₂ O (%)	ACN (%)
0-0,5	95	5
0,5-40	5	100
40-45	100	100

Os espectros de massas foram obtidos com ionização por spray de elétrons sendo registrados em varredura completa (full scan) e sequencial ou tandem (EM/EM), no modo positivo. As condições gerais de operação do equipamento durante as análises foram: voltagem do capilar: 34500 V; 3,0 bar de pressão do nebulizador, o ar seco teve um fluxo de 8L/min e uma temperatura de 200°C. Os espectros de ESI/EM/EM foram registrados com energia de 15 e 60 eV na faixa de m/z 100 a 2000 Da. A calibração de massas realizada com 20 µL padrão calibrador antes e depois da análise. A detecção dos componentes será feita comparando os picos cromatográficos seguido de sua massa exata e o padrão de isótopos (MS¹). A identificação foi baseada nos espectros de fragmentação (MS²) em conjunto com uma database interna de substâncias naturais, associadas com as bibliotecas públicas de espectros como a MassBank (HORAI et al., 2010) e a database universal de produtos naturais (UNPD) (ALLARD et al., 2016).

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nos ensaios biológicos serão utilizadas as seguintes amostras virais e linhagens celulares:

Chikungunya vírus (CHIKV) – A amostra de CHIKV utilizada neste estudo foi cedida pelo Dr. Maurício Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - SP. Para obtenção do pool trabalho de CHIKV, tal alíquota foi multiplicada em células Vero e titulada para determinação da PFU/mL (Unidade Formadora de Placa por mililitro).

Zika vírus (ZIKV) – A amostra de ZIKV utilizada para a propagação *in vitro* deste vírus foi obtida de um paciente com quadro clínico sem complicações, morador do estado de Pernambuco (PE-243/215). Esta amostra foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Erna Geessien Kroon, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Mayaro vírus (MAYV) - A amostra de MAYV usada para a propagação *in vitro* deste vírus foi isolada de um humano no Estado do Acre. Esta amostra foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (SP).

Células Vero: As células Vero são derivadas de rins de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% SFB contendo penicilina (100 UI/ml) e anfotericina B (5 µg/ml), em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Estas células foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade, produção do Chikungunya vírus, para avaliação da atividade antiviral e nas titulações de vírus.

Células C6/36: As células C6/36 são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*, multiplicadas em meio L15 suplementado com 5% SFB contendo penicilina (100 U/mL) e fungizona (5 µg/mL), em ambiente com 5% de CO₂ a 37°C. Estas células serão utilizadas na produção do vírus estoque de Zika vírus.

Células MRC-5: As células MRC-5 são derivadas de fibroblastos de pulmão de um feto masculino de 14 semanas, multiplicadas em meio DMEM suplementado com 5% de SFB, contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL), em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Na tabela número 2, foram apresentadas as características das linhagens celulares (origem histológica e ATCC®), bem como as concentrações de plaqueamento utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral para as linhagens celulares Vero e MRC-5, realizados em placas de 96 poços (de poliestireno de fundo chato (2,0 x 10⁴ células/cavidade)).

Tabela 2 - Linhagens celulares utilizadas nos ensaios biológicos in vitro e concentração de plaqueamentos das células para os ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral, em placas de 96 poços

Linhagem Celular	Origem Histológica	ATCC®	Concentração de plaqueamento (Células/Poço)
MRC-5	Fibroblasto de pulmão	CCL-171™	1,0 x 10 ⁴
Vero	Célula Epitelial Renal	CCL-81™	2,0 x 10 ⁴

4.5.1 Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico com MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

O ensaio colorimétrico com MTT baseia-se na capacidade da mitocôndria de células viáveis em clivar o sal de tetrazólio (MTT), o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol em formazana, através da enzima succinato desidrogenase. O sal de tetrazólio é hidrossolúvel e possui coloração amarela, já a formazana é um precipitado insolúvel em meio aquoso e possui coloração azul-violeta (DENIZOT e LANG, 1986; MOSMANN, 1983; TWENTYMAN e LUSCOMBE, 1987).

As suspensões celulares serão distribuídas em microplacas de 96 poços de poliestireno de fundo chato ($2,0 \times 10^4$ células/cavidade). As culturas serão incubadas em atmosfera úmida, a 5% de CO₂, a 37°C. Serão preparadas diluições das amostras testes em DMEM 1% SFB (Soro Fetal Bovino), em concentrações que variaram entre 200 e 1,562 µg/ml. Após um período de incubação de 24 horas, houve a formação da monocamada celular na superfície das cavidades. Então, o meio de cultura foi removido e 100 µL das soluções diluídas dos compostos e 100 µL de meio de cultura DMEM 1% SFB serão adicionados. O MTT será adicionado 90 minutos antes das leituras (MOSMANN, 1983), que serão feitas em leitor de microplacas, a 490 nm, 72 horas após a adição das substâncias teste/extrato e da suspensão viral.

A toxicidade celular será expressa em termos de concentração citotóxica a 50% (CC50). A porcentagem citotóxica é calculada como $[(A-B)/A] \times 100$, onde A e B são as densidades óticas a 490nm (DO490) das cavidades onde estão presentes células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente.

No contexto desse estudo, o ensaio de citotoxicidade foi conduzido com o objetivo de definir a concentração não citotóxica das substâncias, a fim de que os testes antivirais fossem realizados com utilizando as concentrações das substâncias abaixo do CC50, conforme metodologia descrita por Brandão et al. (2010).

4.5.2 Avaliação da atividade antiviral

Preparo das suspensões estoques virais

Para obtenção dos estoques de vírus, células C6/36, cultivadas em garrafas de 150 cm³, foram infectadas com 0,01 u.f.p. Após a visualização do efeito citopático em 90 a 100% das células, as mesmas serão centrifugadas por 5 min, a 4°C. O sobrenadante será aliquoteado, congelado a -70°C e, posteriormente, titulado segundo REED e MUENCH, (1938).

Avaliação da atividade antiviral pela técnica colorimétrica com o MTT

Foi realizada de acordo com metodologia descrita por BRANDÃO *et al.* (2010). Serão preparadas soluções estoque das amostras, em DMSO, as quais foram avaliadas em concentrações não citotóxicas.

As monocamadas celulares foram cultivadas em placas de 96 cavidades (6,0 x 10⁴ células/cavidade). Após 24 horas de incubação em 5% de CO₂, a 37°C, o meio de cultura (DMEM 5% SFB) será removido e 100 µL das diluições das amostras, serão adicionados em cada cavidade, juntamente com 100 µL da suspensão viral. Em seguida, as culturas serão incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, por 72 horas. Foram realizados os seguintes controles: de células tratadas e não infectadas (CT); de células não tratadas e infectadas (CV) e de células não tratadas e não infectadas (CC). Além disso, todos os testes serão comparados com um controle positivo, interferon α, simultaneamente, em circunstâncias idênticas como relatado anteriormente (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2002). A viabilidade celular será avaliada pela técnica colorimétrica do MTT (MOSMANN, 1983). O sobrenadante será removido e, em seguida, serão adicionados 28,0 µL de uma solução de MTT (2,0 mg/ml em PBS), em cada cavidade. As placas serão incubadas por 1 hora e 30 minutos a 37 °C e, após este tempo de incubação, foram adicionados 130,0 µL de DMSO, em cada cavidade, para dissolver os cristais de formazana. As placas serão mantidas sob agitação, em agitador de placas durante 15 minutos e a densidade óptica será determinada em 492 nm (DO492), em leitor de microplacas.

A concentração eficaz que apresenta 50% de efeito antiviral, isto é, concentração efetiva a 50% (CE50), é expressa como a concentração que promove a proteção de 50% das células tratadas da destruição causada pelo vírus. A porcentagem de proteção é calculada como $[(A-B)/C-B] \times 100$, onde A, B e C são as DO492 das cavidades nas quais estão presentes células tratadas e infectadas (A), não tratadas e infectadas (B), e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente.

4.5.3 Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) é obtido através da razão entre a concentração máxima da amostra que causa 50% de inibição do crescimento celular (CC_{50}) e a concentração mínima da amostra na qual 50% do vírus é inibido (CE_{50}) (COS et al., 2006).

4.5.4 Critérios para avaliação da atividade citotóxica e antiviral

Neste estudo, para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* contra os arbovírus, foram adotados os critérios propostos por Cos et al. (2006) e Ocazonez et al. (2010). De acordo com esses autores, a atividade antiviral *in vitro* é considerada promissora e seletiva quando a concentração citotóxica média (CC_{50}) é $\geq 100,0 \mu\text{g/mL}$, a concentração efetiva média (CE_{50}) é $\leq 50,0 \mu\text{g/mL}$ e o índice de seletividade (IS) é $\geq 2,0$ (COS et al., 2006; OCAZIONEZ et al., 2010).

Além disso, de acordo com Koch et al. (2005), índices de seletividade inferiores a 2,0 indicam que, embora as amostras possam apresentar alguma atividade biológica, elas tendem a ser tóxicas em razão de sua citotoxicidade.

A tabela 3 apresenta os critérios utilizados para avaliação da atividade antiviral contra os arbovírus.

Tabela 3 - Critérios utilizados durante a avaliação dos resultados dos ensaios antivirais *in vitro* contra os vírus Chikungunya vírus (CHIKV), Zika vírus (ZIKV) e Mayaro vírus (MAYV)

ATIVIDADE	CE_{50}	IS
-----------	-----------	----

Não ativo	> 400,00	< 2,0
Baixa	> 100,00	< 2,0
Moderada	> 50,00	≥ 2,0
Alta (promissora e seletiva)	≤ 50,00	≥ 2,0

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE POR CLAE-FR-DAD-EM

A análise por CLAE-FR-DAD-EM (modo positivo) do extrato etanólico dos caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* permitiu a identificação de um conjunto expressivo de flavonoides C-glicosilados e O-glicosilados, majoritariamente derivados de luteolina, com distintas substituições nos açúcares (glicose, pentoses, ramnose) e no anel aromático (metoxilações e acetilações). Os resultados obtidos das análises do extrato etanólico da *Luxemburgia polyandra* foram organizados na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da análise do extrato etanólico da espécie estudada, apresentando a massa molar da substância (Daltons), o tempo de retenção (em minutos), a razão m/z (Massa/carga) do íon precursor, o erro (ppm) e o padrão de fragmentação do íon precursor

	Substância	MM (Da)	TR (min)	HRMS [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Fragmentação (MS ²)
1	orientina - 2 ^o -C-glicosídeo	610	11,7	611.1610	0,3	611.1610 (90.9%), 449.1084 (66.6%), 431.0971 (26.9%), 413.0872 (20.4%), 329.0657 (100.0%), 299.0547 (33.5%). 287.0551 (28.8%)
2	orientina - 2 ^o -C-glicosídeo	610	11,8	611,1609	0,5	611.1616 (100.0%), 449.1089 (79.0%), 431.0986 (32.1%), 413.0872 (26.1%), 329.0655 (97.2%), 299.0554 (22.4%) 287.0545 (33.2%)
3	orientina - 2 ^o -C-	610	12,3	611,1608	0,7	611.1608 (55.1%), 449.1081

	glicosídeo					(72.6%), 431.0972 (22.3%), 413.0876 (21.8%), 353.0663 (26.1%), 329.0658 (90.4%), 311.0563 (19.6%), 299.0548 (32.6%), 287.0555 (25.9%)
4	orientina - 2"-C-glicosídeo	610	12,5	611,1609	0,5	611.1611 (89.6%), 449.1080 (66.6%), 431.0978 (27.0%), 413.0870 (21.3%), 353.0658 (20.0%), 329.0657 (100.0%), 299.0551 (31.7%), 287.0549 (31.4%)
5	orientina - 2"-C-glicosídeo	610	12,6	611,1610	0,3	611.1610 (86.4%), 449.1080 (68.6%), 431.0975 (26.3%), 413.0870 (21.2%), 353.0655 (20.5%), 329.0657 (100.0%), 299.0551 (32.6%), 287.0550 (31.1%)
6	orientina - 2"-C-glicosídeo	610	12,7	611,1610	0,3	611.1610 (78.8%), 449.1080 (66.9%), 431.0974 (26.3%), 413.0868 (21.5%), 353.0655 (21.3%), 329.0656 (100.0%), 299.0550 (32.6%), 287.0549 (30.5%)
7	orientina - 2"-C-glicosídeo	610	13,0	611,1611	0,2	611.1611 (83.0%), 449.1081 (65.3%), 431.0973 (25.2%), 413.0869 (21.8%), 353.0656 (20.6%), 329.0656 (100.0%) 299.0550 (31.6%), 287.0550 (29.3%)
8	2"-glicose-7-metoxi-orientina	624	13,1	625,1763	0,8	625.1772 (52.0%), 463.1231 (100.0%), 445.1143 (7.7%) 343.0819 (32.4%), 329.0653 (7.8%), 313.0713 (26.9%) 301.0711 (51.2%)
9	orientina - pentosil	580	13,2	581, 1503	0,5	581.1502 (100.0%), 449.1082 (53.0%), 431.0973 (27.8%) 413.0872 (23.0%), 353.0657

						(17.4%), 329.0656 (89.3%) 299.0550 (28.6%)
10	2"-glicose-7- metoxi-orientina	624	13,3	625,1764	0,6	625.1767 (52.9%), 463.1235 (100.0%), 445.1126 (7.9%), 343.0813 (30.1%), 313.0708 (25.4%), 301.0707 (54.5%)
11	Vitexina -2"- O - glicosídeo	594	13,6	595,1659	0,7	595.1659 (94.0%), 433.1130 (52.6%), 415.1023 (19.5%), 397.0919 (18.5%), 337.0706 (17.1%), 313.0708 (100.0%) 283.0601 (26.1%), 271.0603 (25.7%)
12	2"-raminose-7- metoxi-orientina	608	13,7	609,1814	0,8	609.1815 (100.0%), 463.1235 (74.8%), 343.0812 (22.2%) 313.0706 (62.4%), 301.0706 (71.7%)
13	2"-raminose-7- metoxi-orientina	608	13,7	609,181	1,5	609.1815 (36.5%), 465.1304 (5.9%) 463.1225 (100.0%), 449.1418 (1.5%), 303.0867 (8.1%), 301.0718 (31.1%)
14	2"-raminose-7- metoxi-orientina	608	13,7	609,18	3,1	609.2739 (1.2%), 609.1802 (100.0%), 463.1211 (9.7%), 449.1423 (1.7%), 303.0871 (1.2%), 301.0715 (1.6%)
15	7 - metoxi - orientina	462	13,7	463,1234	1,3	463.1234 (100.0%), 343.0812 (5.3%), 329.0653 (3.4%), 315.0871 (3.5%), 315.0502 (6.0%), 301.0709 (4.0%), 299.0544 (4.2%)
16	2"-raminose-7- metoxi-orientina	608	13,7	609,1814	0,8	609.1814 (100.0%), 463.1234 (75.6%), 343.0811 (21.5%), 313.0706 (63.0%), 301.0706 (71.0%)
17	Vitexina -2"- O - glicosídeo	594	13,8	595,1654	1,51	595.1657 (100.0%), 463.1239 (47.5%), 343.0808 (12.3%) 313.0705 (51.9%), 301.0710 (34.8%)

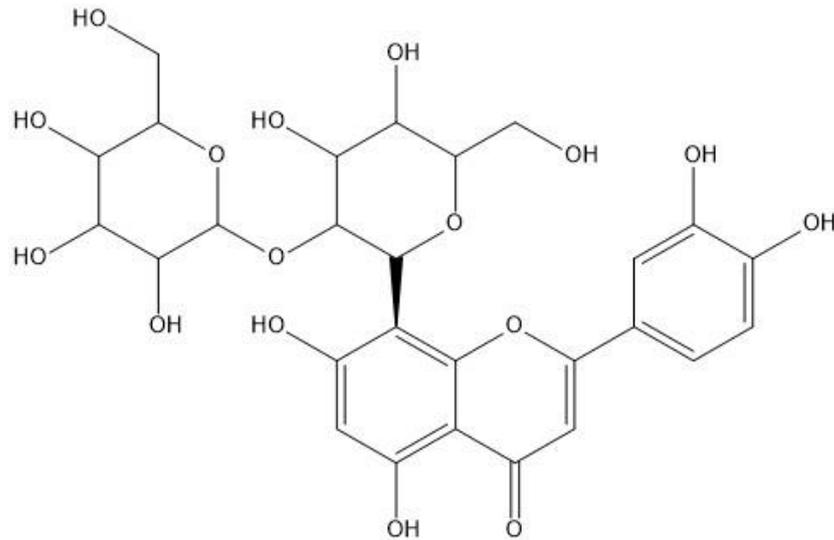
18	vitexina/isovitexina	432	13,9	433,1128	1,4	433.1126 (100.0%), 415.1028 (15.6%), 397.0916 (15.4%), 337.0694 (12.4%), 323.0927 (12.0%), 313.0703 (57.3%), 283.0597 (42.2%)
19	7 - metoxi - orientina	462	14,0	463,1235	1,1	463.1235 (100.0%), 343.0809 (5.8%), 329.0652 (3.2%), 315.0862 (2.7%), 315.0497 (7.2%), 301.0703 (3.9%), 299.0548 (4.7%)
20	dimetoxi - luteolina - c - pentosil - raminose	592	14,4	593,1859	1,8	593.1864 (100.0%), 447.1283 (72.8%), 411.1076 (13.1%), 327.0857 (24.2%), 297.0761 (74.0%), 285.0758 (72.0%)
21	dimetoxi - luteolina - c - pentosil - pentosil (arabinose, xilose ou apiose)	578	14,4	579,1711	0,3	579.1711 (100.0%), 447.1302 (50.1%), 327.0861 (30.6%), 309.0771 (15.6%), 297.0752 (30.0%), 285.0771 (57.0%), 179.0339 (19.5%)
22	orientina - pentosil	580	14,9	581,1508	-0,3	581.1508 (81.7%), 449.1076 (37.3%), 431.0965 (33.6%), 413.0869 (25.7%), 383.0773 (19.3%), 353.0648 (20.3%), 329.0654 (100.0%), 299.0565 (20.6%)
23	O - acetil orientina O glicosídeo	652	14,9	653,1714	0,5	653.1714 (67.7%), 491.1185 (72.7%), 473.1079 (23.1%), 353.0654 (25.9%), 329.0657 (100.0%), 311.0553 (32.2%), 299.0550 (26.3%), 287.0547 (21.3%)
24	O - acetil orientina O glicosídeo	652	15,2	653,1713	0,6	653.1714 (84.6%), 491.1185 (63.8%), 473.1078 (18.7%), 353.0655 (22.8%), 329.0657 (100.0%), 311.0550 (31.4%), 299.0552 (22.9%), 287.0550 (22.4%)

25	O - acetil orientina O glicosídeo	652	15,3	653,1712	0,8	653.1714 (86.3%), 491.1186 (63.2%), 473.1076 (17.9%), 353.0655 (22.6%), 329.0657 (100.0%), 311.0550 (30.6%), 299.0552 (23.4%), 287.0550 (22.6%)
26	Trimetoxi - orientina - pentosil	622	15,6	623,1607	0,8	623.1611 (94.4%), 491.1184 (44.8%), 473.1087 (22.1%), 353.0655 (24.8%), 329.0658 (100.0%), 311.0552 (25.1%) 299.0554 (37.6%)
27	Acetil orientina	490	15,6	491,1185	0,8	491.1185 (100.0%), 455.0976 (12.1%), 353.0657 (15.2%), 329.0656 (64.8%), 313.0702 (11.5%), 311.0550 (22.8%) 299.0551 (48.9%)
28	Amentoflavona	538	12,4	539,0968	1,8	539.0971 (100.0%), 497.0867 (2.8%), 431.0757 (3.0%), 389.0645 (2.8%), 387.0859 (17.2%)
29	Diidro Ochna Flavona	540	25,6	541.1107	4,9	541.1128 (100.0%), 433.0912 (17.4%), 415.0810 (45.6%), 389.1017 (43.7%), 387.0860 (12.3%), 257.0444 (18.1%) 153.0180 (90.7%)
30	Diidro Ochna Flavona	540	25,8	541.1128	1,1	541.1128 (100.0%), 433.0916 (17.2%), 415.0810 (48.1%), 389.1017 (45.6%), 387.0863 (9.1%), 257.0443 (15.8%), 153.0181 (46.7%)

Entre 11,7 e 13,0 minutos, observou-se um grupo de picos correspondentes a isômeros denominados orientina-2"-C-glicosídeo (MM 610 Da) (Figura 8), exibindo espécies protonadas $[M+H]^+$ com m/z ~611 e fragmentação característica com íons de m/z 449, 431, 413, e especialmente m/z 329, revelando perda de resíduos glicosídicos e confirmando o núcleo luteolínico C-glicosilado. Em seguida, foram

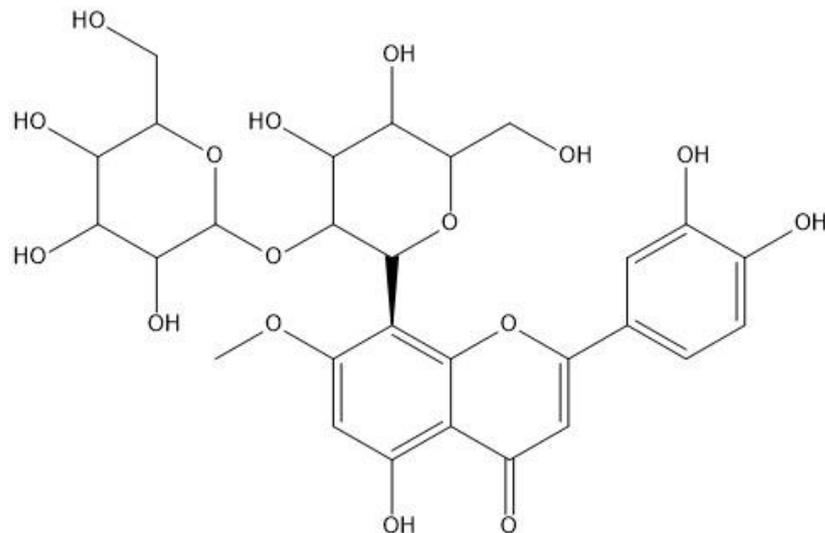
detectados compostos metoxilados, como 2''-glicose-7-metoxi-orientina ($[M+H]^+ = 625$) (Figura 9), os quais apresentaram fragmentação típica com íons fragmentos em m/z 463, 343 e 301, condizentes com a presença de um grupo metoxi no anel A.

Figura 8 - Orientina - 2'' - C - glicosídeo



Fonte: autoria própria

Figura 9 - Figura 9: 2''-glicose-7-metoxi-orientina



Outro flavonoide identificado e caracterizado foi orientina-pentosídeo ($[M+H]^+ = 581$) (figura 10), mantendo o perfil de fragmentação de flavonas C-glicosiladas (m/z 449/329), sugerindo substituição por pentose na posição 2''. Na faixa de 13,6 a 13,9 min, foram propostos vitexina/isovitexina-O-glicosídeos ($[M+H]^+ = 595$) (figura 11),

bem como seus correspondentes C-glicosilados ($[M+H]^+ = 433$) (figura 12), variando quanto à posição de glicosilação. Em ambos os casos, os íons-produto m/z 313 e 283 reforçam a substituição no anel A, coerente com estruturas C-6 ou C-8 glicosiladas de apigenina e luteolina.

Figura 10 - Orientina-pentosídeo

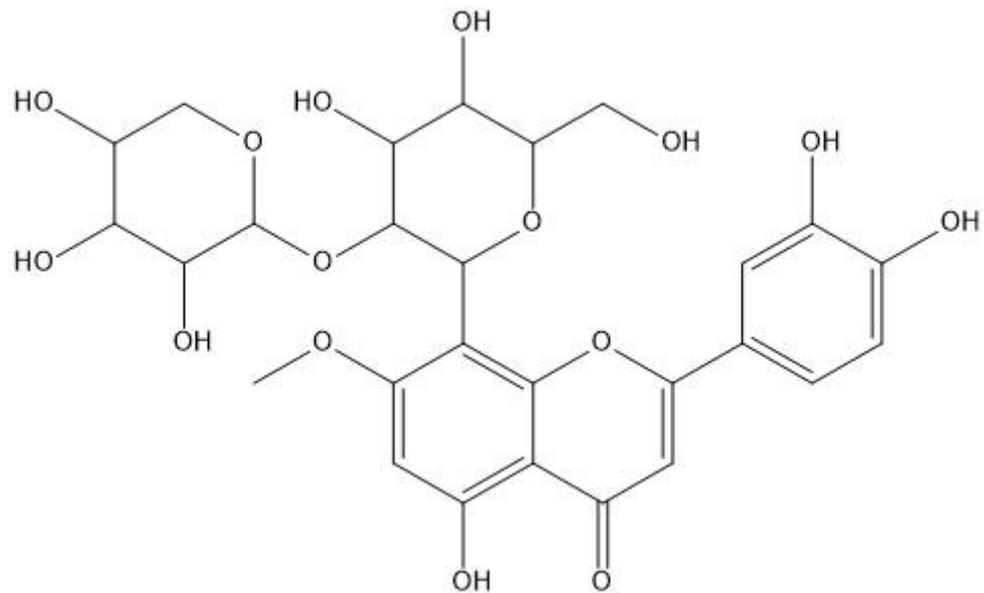


Figura 11 - Vitexina -2''- O - glicosídeo

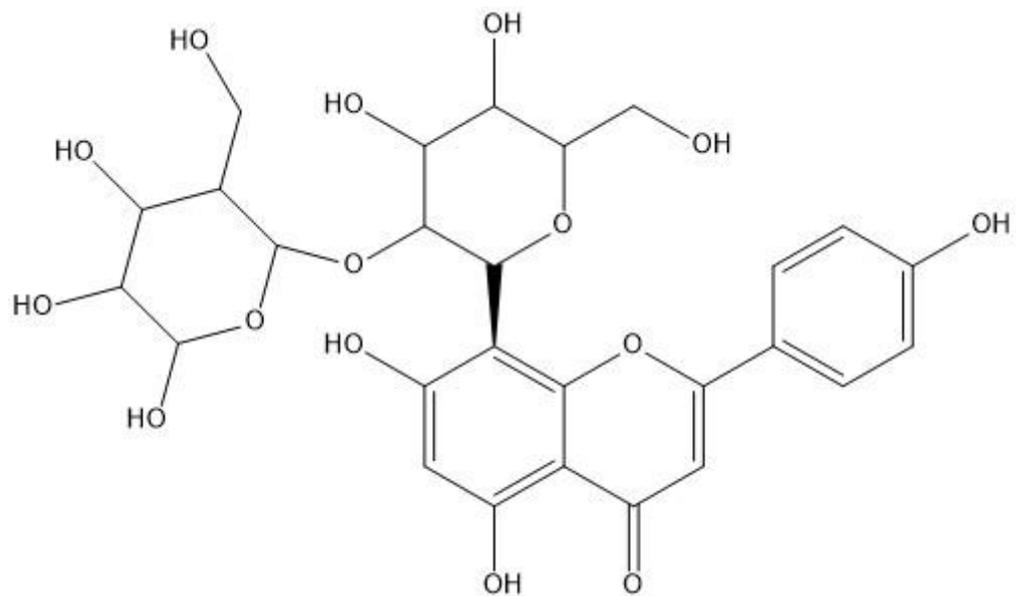
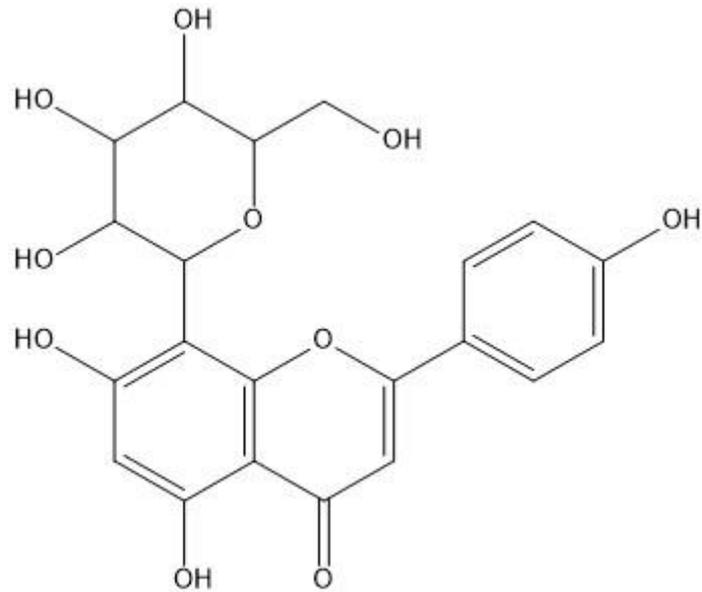


Figura 12 - Vitexina



A região cromatográfica entre 13,7 e 15,6 min revelou a presença de flavonoides modificados, incluindo 2''-raminose-7-metoxi-orientina ($[M+H]^+ = 609$) (figura 13), 7-metoxi-orientina ($[M+H]^+ = 463$) (figura 14) e três isômeros de O-acetil-orientina O-glicosídeo ($[M+H]^+ = 653$) (figura 15). Esses compostos apresentaram perfil fragmentário compatível com perdas sequenciais de açúcares (hexose, pentose e ramnose) e fragmentos aglicônicos recorrentes a m/z 329/313/301, corroborando a prevalência de flavonoides C-glicosilados metoxilados (figuras 16, 17 e 18) e acetilados na espécie estudada (figuras 19).

Figura 13 - 2''-raminose-7-metoxi-orientina

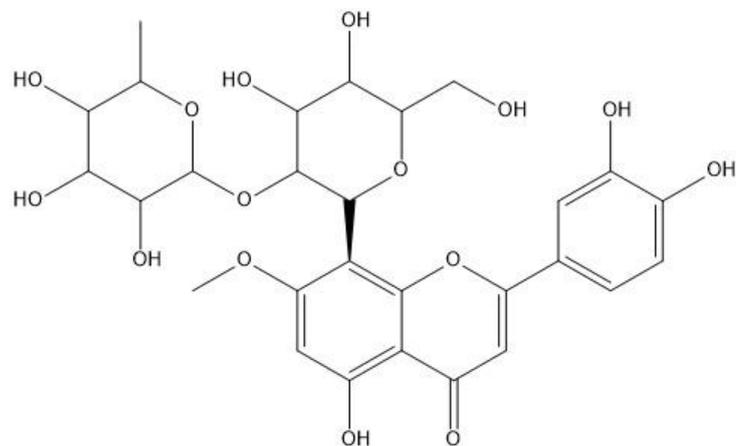


Figura 14 - 7-metoxi-orientina

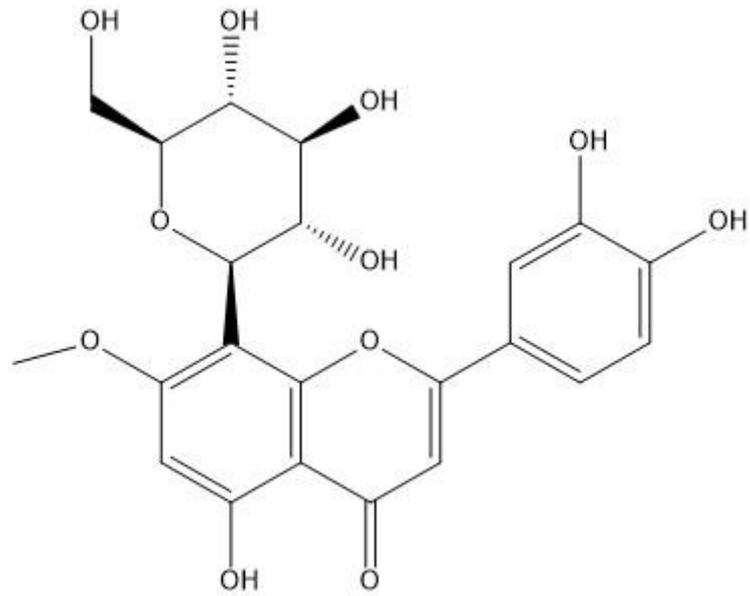


Figura 15 - O-acetil-orientina-O-glicosídeo

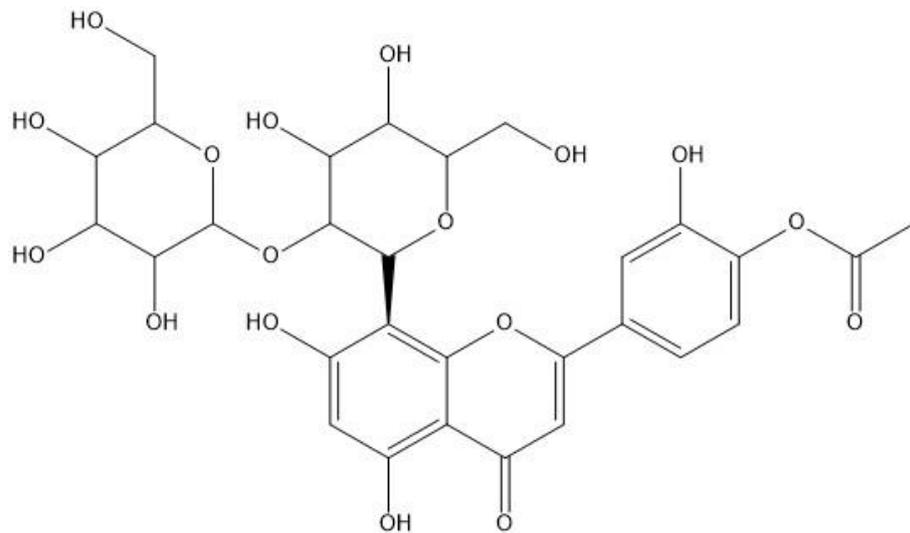


Figura 16 - Trimetoxi - orientina - pentosil

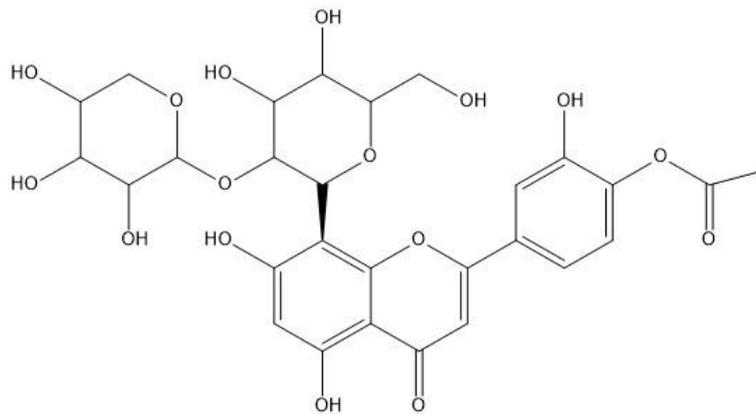


Figura 17 - Dimetoxi - luteolina

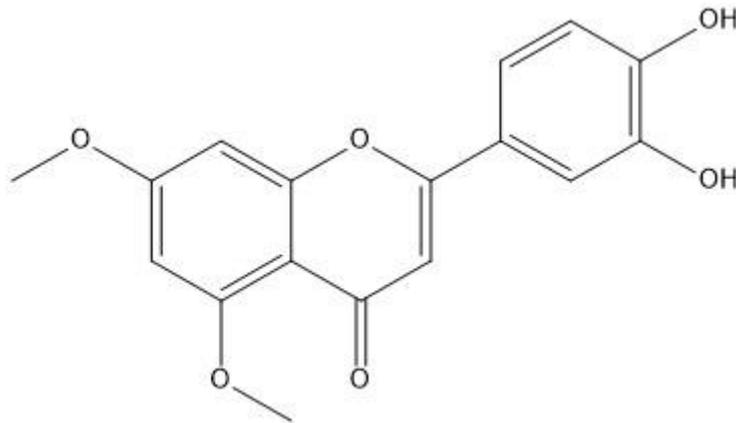


Figura 18 - Dimetoxi - luteolina - C - pentosil

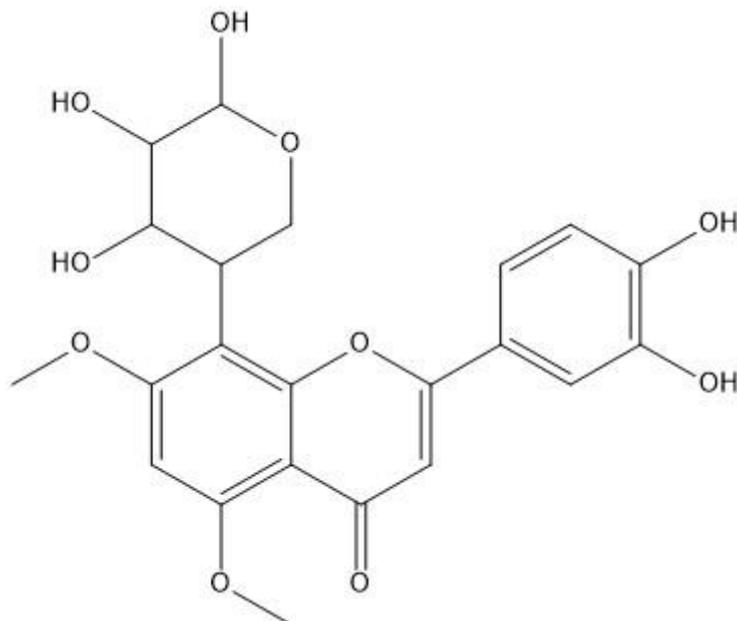
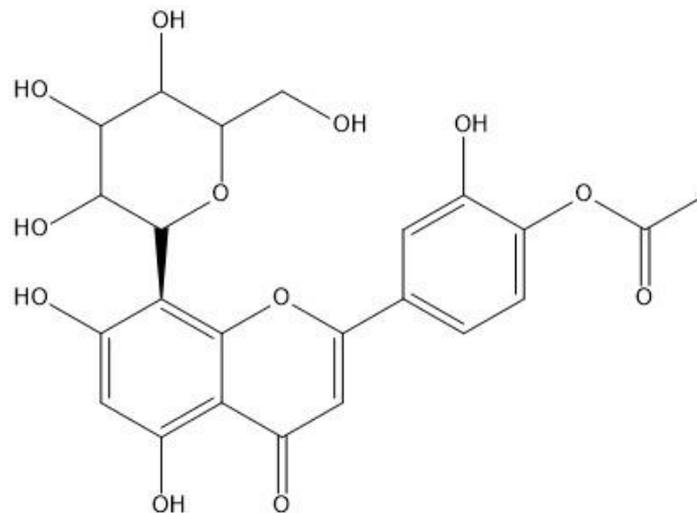


Figura 19 - Acetil orientina



Além das flavonas identificadas três estruturas compatível com a subclasse dos biflavonoides foram detectados. Estas estruturas foram caracterizadas como dois isômeros da diidro-Ochnaflavona (figura 20) $[M+H]^+$ de m/z 541 e tempos de retenção de 25,6 e 25,8 min, cuja fragmentação (m/z 433, 415, 389, 257) é característica de biflavonas hidrogenadas anteriormente descritas em representantes da família Ochnaceae. A outra estrutura foi caracterizado como sendo a amentoflavona (figura 21) com massa molar 538 Da.

Figura 20 - Diidro-ochna-flavona

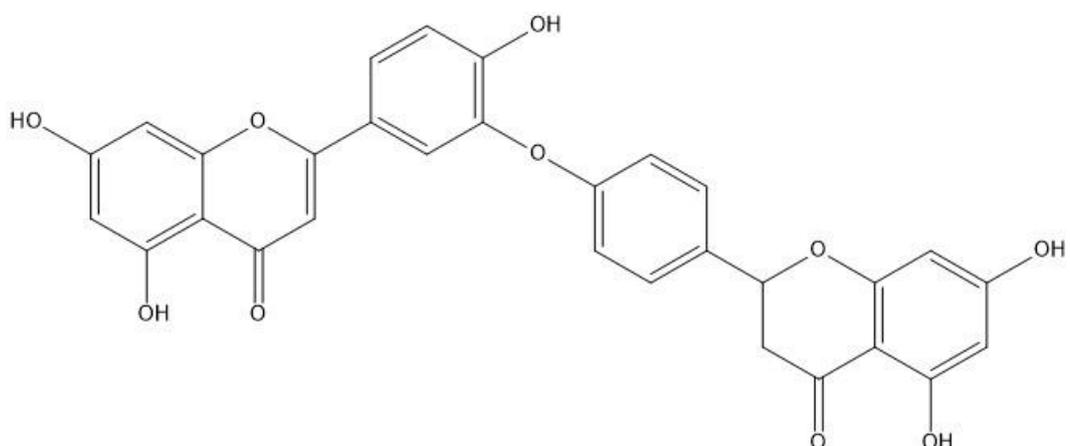
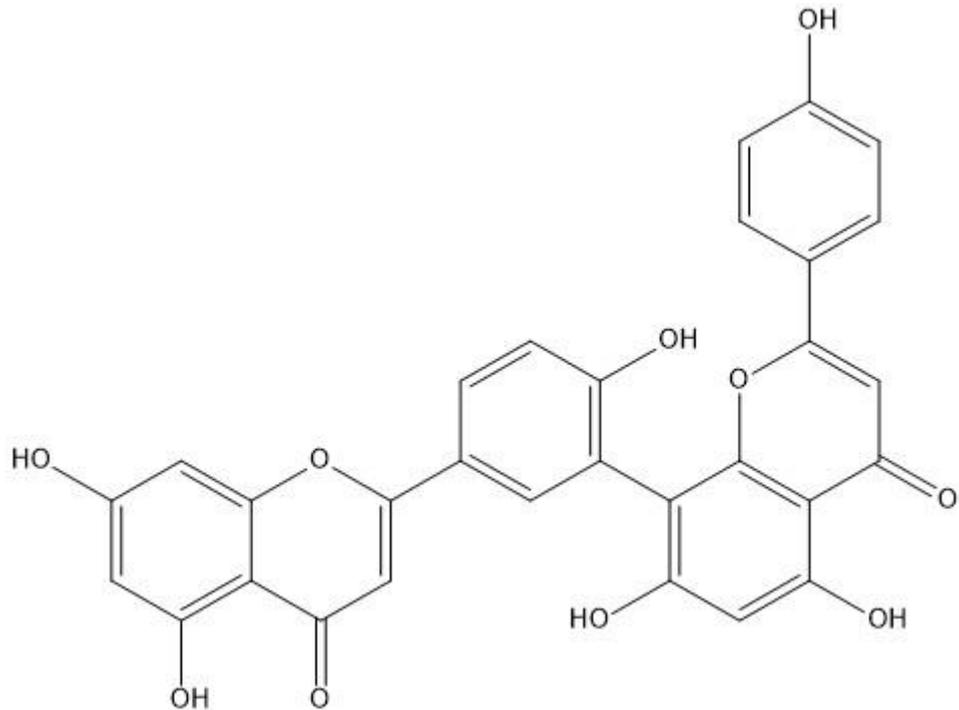


Figura 21 - Amentoflavona



De forma geral, os resultados demonstram que *Luxemburgia polyandra* apresenta um perfil químico complexo e rico em flavonoides C-glicosilados, especialmente orientina, vitexina/isovitexina e seus respectivos derivados O-glicosilados/acilados/metoxilados. A elevada diversidade estrutural observada sugere um potencial fitoquímico relevante e justifica a continuidade dos estudos visando isolamento, caracterização estrutural completa e avaliação farmacológica dos compostos majoritários. A partir da análise do padrão de fragmentação das substâncias existentes no extrato etanólico da espécie estudada, obtido através do espectro de massas, foram propostas as estruturas moleculares das substâncias.

Os resultados obtidos corroboram dados fitoquímicos reportados para outras espécies de Ochnaceae, como *Ouratea hexasperma* e *Ochna integerrima*, nas quais flavonas C-glicosiladas como orientina, vitexina e derivados metoxilados foram descritos como compostos majoritários (FIDELIS et al., 2014; REUTRAKUL ET AL., 2007).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIVIRAL FRENTE AOS ARBOVÍRUS

No contexto do presente trabalho, a avaliação da citotoxicidade frente a linhagem celular vero foi feita antes dos ensaios antivirais pois estes são feitos a partir de concentrações inferiores a CC_{50} . Ou seja, os testes antivirais são realizados em concentrações não citotóxicas das substâncias em questão (BRANDÃO et al., 2017).

As células MRC-5 foram utilizadas para avaliar o potencial citotóxico dos extratos em células humanas normais, sendo a baixa citotoxicidade considerada um parâmetro favorável à continuidade dos estudos antivirais. Já as células Vero, empregadas nos ensaios antivirais, foram usadas para determinar a CC_{50} .

O extrato e frações da espécie foram submetidos ensaios biológicos, e os resultados da citotoxicidade e da atividade antiviral obtidos estão descritos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Atividade citotóxica (CC_{50}), nas células Vero e MRC-5, do extrato etanólico de caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* e frações enriquecidas, realizadas por meio do ensaio colorimétrico com o MTT

PLANTA	PARTE	FRAÇÃO	CITOTOXICIDADE	
			MRC-5 $CC_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$	VERO $CC_{50} \mu\text{g mL}^{-1}$
<i>Luxemburgia polyandra</i>	Caule/folha	Extrato	$55,23 \pm 1,34$	$181,10 \pm 1,49$
		Etanólico		
		AcOEt	$62,87 \pm 1,45$	$86,88 \pm 1,43$
		CHCl_3	$39,35 \pm 1,39$	$53,22 \pm 1,27$
		MeOH/ H_2O	> 400	$47,73 \pm 1,51$

O extrato etanólico foi considerado tóxico frente a linhagem celular MRC-5, pois apresentou CC_{50} inferior a $100 \mu\text{g/mL}$ ($55,23 \mu\text{g/mL}$). Porém não foi considerado tóxico nas células Vero, visto que a CC_{50} obtida foi maior do que $100 \mu\text{g/mL}$ ($181,10 \mu\text{g/mL}$).

Para as frações em AcOEt e CHCl_3 , tanto frente as células Vero quanto as células MRC-5 a citotoxicidade foi alta (ambos apresentaram CC_{50} abaixo de $100 \mu\text{g/mL}$), frente as duas linhagens celulares. Já para a fração aquosa, a citotoxicidade foi considerada baixa somente frente as células MRC-5 (maior do que $400 \mu\text{g/mL}$) e foi considerada citotóxica frente as células Vero ($47,73 \mu\text{g/mL}$).

Verificou-se, portanto, que após o fracionamento do extrato etanólico, houve um aumento na citotoxicidade.

Tabela 6 - Atividade antiviral (CE50) aos vírus Zika, Chikungunya e Mayaro, na célula VERO, apresentando os respectivos índices de seletividade (IS), do extrato etanólico de caules e folhas de *Luxemburgia poyandra* e frações, método colorimétrico com o MTT

PLANTA	PARTE	FRAÇÃO	ATIVIDADE ANTIVIRAL					
			ZIKV EC50 µg mL ⁻¹	IS	CHIKV EC50 µg mL ⁻¹	IS	MAYV EC50 µg mL ⁻¹	IS
<i>Luxemburgia poyandra</i>	Caule/folha	Extrato Etanólico	71,25 ± 1,48	2,54	NA	-	48,90 ± 2,52	3,7
		AcOEt	25,33 ± 2,68	3,43	12,81 ± 1,96	6,78	47,07 ± 3,10	1,85
		CHCl ₃	NA	-	NA	-	NA	-
		MeOH/H ₂ O	NA	-	NA	-	NA	-

Nota: IS (Índice de Seletividade): $CC_{50(Vero)}/EC_{50(Vero)}$, NA: Não Ativo; -: Não determinado.

O extrato etanólico foi ativo somente frente ao ZIKV e MAYV, apresentando uma atividade moderada (EC50 acima de 50 µg/ML e $IS \geq 2$) frente ao ZIKV (EC50 igual a 71,25 µg/ML e IS 2,54) e alta, sendo considerada promissora e seletiva (EC50 abaixo de 50 µg/ML e $IS \geq 2$), frente ao MAYV (EC50 igual a 48,90 µg/ML e IS 3,7).

Após o fracionamento, somente a fração em AcOEt apresentou atividade. Pode-se considerar que, para os vírus Zika e Chikungunya, a atividade apresentada foi alta (EC50 abaixo de 50 µg/ML e $IS \geq 2$), sendo mais ativa contra o CHIKV (EC50 igual a 12,81 µg/ML e IS 6,78). Para o MAYV, a fração apresentou atividade antiviral, entretanto a citotoxicidade é alta. As frações em CHCl₃ e em MeOH/H₂O não apresentaram atividade contra nenhum dos vírus.

Na literatura, existem estudos sobre o gênero *Ouratea* (Ochnaceae) que mostram que os extratos são ativos contra vírus. Os extratos da espécie *Ouratea lucens* foram ativos frente ao herpes vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) (FIDELIS et al., 2014). Porém não são descritas a atividade antiviral para a espécie avaliada neste estudo, sendo esses resultados apresentados inéditos.

7 CONCLUSÃO

A caracterização química do extrato etanólico dos caules e folhas de *Luxemburgia polyandra* (Ochnaceae) revelou uma notável diversidade de flavonoides, especialmente compostos C-glicosilados derivados de luteolina e vitexina, bem como seus análogos metoxilados, acetilados e ramnosilados. Os resultados obtidos indicam que essa espécie apresenta um perfil fitoquímico consistente com outros representantes da família, reforçando seu potencial como fonte de substâncias biologicamente ativas. Ademais, os estudos preliminares de atividade antiviral e citotóxica demonstraram respostas promissoras, sugerindo que o extrato e seus constituintes majoritários merecem ser explorados em etapas subsequentes de isolamento, elucidação estrutural e avaliação de atividades biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, P.-M. et al. Integration of Molecular Networking and *In-Silico* MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 1 mar. 2016.

AMADO, N. G. et al. Flavonoids: potential wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Sci.** v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.

AMARAL, M.C.E.,. Phylogenetische systematik der Ochnaceae. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 113, p 105-196, 1991

BARROS, E. R. DE et al. Epidemiologia do vírus Mayaro na América Latina entre 2009 a 2019. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218**, v. 2, n. 5, p. e25327, 10 jun. 2021.

BARROWS, NICHOLAS J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 2, p. 259–270, ago. 2016.

BETANCUR-GALVIS, L. et al. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the Euphorbia genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 541–546, jun. 2002.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2-3, p. 157–177, maio 2001.

BOSCH, R. et al. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals. **Antioxidants**, v. 4, n. 2, p. 248–268, 26 mar. 2015.

BOSSO, A. A. Identificação de bisflavonóides de *Luxemburgia nobilis* e *Ouratea Semiserrata* (Ochnaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ufrj.br**, 2025.

BRAH, B. H. **Congonha-do-Campo (*Luxemburgia polyandra*)**. Disponível em: <<https://www.brah.com.br/ir/congonha-do-campo-luxemburgia-polyandra/>>. Acesso em: 1 set. 2025.

BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469–76, out. 2010.

BRANDÃO, G.C., et al. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 2011, v 3, n 4, p 223-236, 2011.

BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral Activity of *Fridericia formosa* (Bureau) L. G. Lohmann (Bignoniaceae) Extracts and Constituents. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2017, p. 1–11, 1 jan. 2017.

BRITO, M. DE V.; FERNANDES, E. D. DE A.; FARIAS, E. M. Dinâmica epidemiológica da febre do Mayaro nas Américas: Uma revisão integrativa da literatura. **Ciências da Saúde: desafios, perspectivas e possibilidades - Volume 1**, p. 192–202, 2021.

CARVALHO, M.G.; ALBUQUERQUE, L.R.M.; MENDES, L.S.; GUILHON, G.M.S. P.; RODRIGUES, S.T. Biflavonoids and Terpenoids Isolated from the leaves of *Ouatea icrodonta* Engl. (Ochnaceae). **Revista Latinoamericana de Química**, v. 36, n. 3, 2008.

CECHINEL F., V., YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova [online]**. 1998, vol.21, n.1, pp.99-105.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, jul. 2006.

CRÉANGE, A. Guillain-Barré syndrome: 100 years on. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 12, p. 770–774, dez. 2016.

DA SILVA, V. C. et al. Anti-inflammatory activities of flavonoids from *Luxemburgia octandra* flowers. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 6, p. 961–963, jan. 2011.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, maio 1986.

DIAS, B. F. S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. **Campinas**: André Tosello, 1996.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283–285, mar. 2015.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.

EKALU, A.; HABILA, J. D. Flavonoids: isolation, characterization, and health benefits. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 9, n. 1, 29 set. 2020.

FERES, Fabiola. O genero Luxemburgia A. St.-Hil. (Ochnaceae): revisão taxonomica e estudo cladístico. 2001. 158p. **Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP**. Disponível em: 20.500.12733/1589398. Acesso em: 23 jul. 2025

FIDELIS, Q. C. et al. Ouratea genus: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 1–19, jan. 2014.

GAO, G. F. From “A”IV to “Z”IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1157–1159, mar. 2018.

GOODFELLOW, J. A.; WILLISON, H. J. Guillain–Barré syndrome: a century of progress. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 12, p. 723–731, 18 nov. 2016.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; REIS, M. S.; ORTH, A. I. A diversidade dos recursos genéticos vegetais e a nova pesquisa agrícola. **Ciência Rural**. 1998, vol.28, n.3, pp.521-528

HORAI, H. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703–714, 7 jul. 2010.

HUNG, J. Y. et al. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**, v. 68, n. 3, p. 366-374, 2009.

JADVAR, H.; ALAVI, A.; GAMBHIR, S. S. 18FFDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. **J. Nucl. Med.**, v. 50, n. 11, p. 1820-7, 2009.

JO, A.; YOO, H. J.; LEE, M. Robustaflavone Isolated from *Nandina domestica* Using Bioactivity-Guided Fractionation Downregulates Inflammatory Mediators. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1789, 8 maio 2019.

KADIR, A. S. L.; YAAKOB, H.; MOHAMED ZULKIFLI, R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 677–689, 2013.

KLUKNAVSKY, M. et al. (–)-Epicatechin Reduces the Blood Pressure of Young Borderline Hypertensive Rats During the Post-Treatment Period. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 96, 23 jan. 2020.

Li YL, Chen X., Niu SQ, Zhou HY, Li QS (2020). Efeitos antioxidantes protetores da mentoflavona e dos flavonoides totais de *Hedyotis difusa* em células HL-O2 induzidas por H₂O₂ através da via ASK1/p38 MAPK. **Chem. Biodivers** 17 (7), e2000251.

LIKHITWITAYAWUID, K. et al. Flavonoids from *Ochna integerrima*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 4, p. 353–357, fev. 2001.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, fev. 2014.

Luxemburgia in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB31701>>. Acesso em: 31 ago. 2025

MBING, J. N. et al. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. **Phytochemistry**, v. 63, n. 4, p. 427–31, jun. 2003.

MBING, J. N. et al. Two biflavonoids from *Ouratea nigroviolacea*. **Phytochemistry**, v.

67, n. 24, p. 2666–2670, 7 set. 2006.

MESSANGA, B. B. et al. Triflavonoids of *Ochna calodendron*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 4, p. 435–438, fev. 2002.

MOREIRA, I. C. et al. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. **Phytochemistry (United Kingdom)**, v. 35, n. 6, p. 1567–1572, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dez. 1983.

MOURÃO, M. P. G. et al. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42–46, jan. 2012.

MUTOH, M. et al. Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. **Japanese journal of cancer research**, v. 91, n. 7, p. 686–691, 1 jul. 2000.

NASCIMENTO, JET; MORAIS, S. M. Plantas medicinais nativas brasileiras com atividade cicatrizante. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 19, n. 1, p. 118-128, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, 12 mar. 2020.

OCAZONEZ, R. E. et al. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 304–309, maio 2010.

PEREIRA, W. L. et al. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n. 4, p. 798-806, 2015.

PEPE, V. L. E. et al. Proposta de análise integrada de emergências em saúde pública por arboviroses: o caso do Zika vírus no Brasil. **Saúde em Debate**, v. 44, n. spe2, p. 69–83, jul. 2020.

PINTO JUNIOR, V. L. et al. Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, v. 28, n. 6, p. 760, 3 dez. 2015.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446–1455, dez. 2007.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, maio 1938.

REUTRAKUL, V. et al. Anti HIV-1 Flavonoid Glycosides from *Ochna integerrima*. **Planta Medica**, v. 73, n. 7, p. 683–688, jun. 2007.

RIBEIRO, A. C. DA S. et al. Infection profiles of Mayaro virus and Chikungunya virus in mammalian and mosquito cell lineages. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 4, jun. 2018.

ROTSSEN, G. et al. Common arboviruses and the kidney: a review. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 46, n. 3, 1 set. 2024.

SALVADOR, G. S. et al. A família Ochnaceae DC. no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 423–434, 1 jun. 2010.

SILVEIRA, E. R.; CARVALHO, J. C S; MATOS, T. M. Da planta ao fármaco: uma abordagem fitoquímica. **Laboratório de Fisiologia Vegetal**, p. 166, 2021.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/001476732>>. Acesso em: 1 set. 2025.

SUZART, L. R. et al. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros Ouratea e Luxemburgia (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984–987, 1 ago. 2007.

TEIXEIRA, R. et al. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8151–8176, 17 jun. 2014.

TWENTYMAN, P.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279–285, set. 1987.

UNITED STATES. **Food and Drug Administration**. *Drug Approvals and Databases*. Disponível em: <https://www.fda.gov/about-fda/fda-organization>. Acesso em: 1 set. 2025

VIEIRA, R. C. F. Estudo do uso de plantas medicinais e/ou produtos a base de plantas medicinais como tratamento complementar, por pacientes atendidos no Centro de Pesquisas Oncológicas - CEPON/SC. **Ufsc.br**, 2008.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**,v.51, p.239-254, 1996.

WHO. **Global Strategy for dengue prevention and control, 2012–2020**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241504034>>.

WHO. **Mayaro virus disease – French Guiana, 2020**. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/mayaro-virus-disease--french-guiana-france>

WHO. **Scientific Group on Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases & World Health Organization. (1985)**. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 28 february to 4 March 1983]. World Health Organization. <https://iris.who.int/handle/10665/39922>