



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



Camila Portruneli

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DE DERIVADOS
SINTÉTICOS DE EUGENOL FRENTE AOS ARBOVÍRUS CHIKUNGUNYA, ZIKA,
MAYARO E OROPOUCHE**

OURO PRETO

2026

CAMILA PORTRUNELI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* DE DERIVADOS
SINTÉTICOS DE EUGENOL FRENTE AOS ARBOVÍRUS CHIKUNGUNYA, ZIKA,
MAYARO E OROPOUCHE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Farmácia pela Escola de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro Preto,
Minas Gerais, Brasil.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.
Co-orientadora: Dra. Adriana Cotta Cardoso
Reis.

OURO PRETO

2026

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P853a Portruneli, Camila.

Avaliação da atividade antiviral in vitro de derivados sintéticos de eugenol frente aos arbovírus chikungunya, zika, mayaro e oropouche. [manuscrito] / Camila Portruneli. - 2026.
72 f.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Eugenol. 2. Antivirais. 3. Arbovírus. I. Brandão, Geraldo Célio. II. Reis, Adriana Cotta Cardoso. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.281.8

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza -CRB6/2322



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Camila Portruneli

Avaliação da atividade antiviral in vitro de derivados sintéticos de eugenol frente aos arbovírus Chikungunya, Zika, Mayaro e Oropouche

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

Aprovada em 23 de agosto de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)
Profa. Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)
Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)
Prof. Dr. Jordano Augusto Carvalho Sousa - 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 04/08/2026



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Celio Brandao**, **PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/08/2026, às 13:27, 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 **1152053** e o código CRC **377BFCC1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força e pela luz que me sustentaram em cada etapa desta caminhada acadêmica.

À minha mãe Ana Cláudia, ao meu pai Adilson, a minha irmã Natália, minha tia Andréia e a minha avó Guiomar, que sempre acreditaram em mim de forma incondicional, desde os primeiros sonhos de infância até a concretização deste momento. Esta conquista é tão minha quanto de vocês, pois, graças à base sólida que me deram, consegui voar em busca deste sonho. Deixar vocês orgulhosos sempre será a minha maior felicidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão, e à coorientadora, Dra. Adriana Cotta Reis, pela paciência, dedicação e confiança depositada em mim. O apoio e a orientação de vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Lucas, por ser exemplo de companheirismo, estando comigo em todos os momentos, sempre me incentivando e me dando apoio. Sua presença tornou esta jornada ainda mais especial. Que venham muitas outras conquistas, para que possamos nos orgulhar um do outro.

Às queridas cafofinhas, que, com o jeitinho único de cada uma, me ensinaram muito e me ajudaram a me tornar uma pessoa melhor. Obrigada por tornarem esta jornada mais leve e divertida, e por me darem suporte quando precisei. E ao Barack, que tantas vezes me consolou e animou com seus lambeijos cheios de amor.

Aos presentes que o curso de Farmácia me deu, que vivenciaram comigo essa etapa tão especial e estiveram sempre ao meu lado, motivando e incentivando. Sem vocês, a graduação não teria sido a mesma, obrigada por terem sido tão importantes para mim. Em especial a: Ana Clara da Silva, Maria Clara, Larissa Melo, Lucas Gomes, Júlio César, Marvin Haji, Ana Beatriz Ferreira, Gustavo Campbell, Ana Luiza Viana, Mariana Carvalho, Arthur Bueno.

As minhas amigas de longa data, Maibi, Jady, Carol e Nicole, que mesmo a quilômetros de distância, nunca deixaram de estar ao meu lado.

Aos colegas dos laboratórios LQMB e LBTM, pela oportunidade de aprendizado e pelas experiências compartilhadas.

À Universidade Federal de Ouro Preto, aos professores do curso e a cidade de Ouro Preto, que me deram suporte e me auxiliaram durante todos esses anos. Que honra em fazer parte da Escola de Farmácia mais antiga da América Latina! Essa cidade sempre terá uma parte do meu coração!

Ao CNPq (405032/2021-8) pelo apoio financeiro, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant nº. APQ-01375-24, e RED-00170-23], pelo apoio financeiro.

Ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Moléculas, (CiPharma/Ufop) pelas análises espectrométricas.

Ao Prof. Guilherme Rocha Pereira, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Departamento de Física e Química, Belo Horizonte, MG, Brasil, pela síntese das moléculas.

RESUMO

As arboviroses, como dengue, chikungunya, febre mayaro, zika e febre oropouche, representam um desafio crescente de saúde pública no Brasil, com aumento expressivo de casos nos últimos anos, especialmente em Minas Gerais. Apesar da disponibilidade de algumas vacinas, ainda não existem antivirais específicos, e o tratamento permanece restrito a medidas de suporte clínico. Nesse contexto, torna-se essencial a busca por novas moléculas com potencial terapêutico. Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de 21 derivados sintéticos ou modificados do eugenol em células Vero, por meio da determinação da concentração citotóxica média (CC_{50}). Nos ensaios de atividade antiviral *in vitro* foi determinada a concentração efetiva média (CE_{50}) contra os vírus *Alphavirus chikungunya* (CHIKV), *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), *Alphavirus mayaro* (MAYV) e *Orthobunyavirus oropoucheense* (OROV), utilizando o método colorimétrico do MTT. A relação entre CC_{50} e CE_{50} permitiu o cálculo do índice de seletividade (IS), parâmetro fundamental para avaliar a eficácia e segurança dos compostos testados. Os ensaios foram realizados utilizando o método colorimétrico do MTT. Foram testadas 21 substâncias, das quais a molécula identificada como **E-11** apresentou resultados mais promissores. Frente ao ZIKV, exibiu CE_{50} de $38,23 \pm 5,55 \mu\text{M}$ e índice de seletividade maior que 14,80. Contra o OROV, apresentou CE_{50} de $68,34 \pm 4,47 \mu\text{M}$ e índice de seletividade maior que 8,28; frente ao MAYV, CE_{50} de $75,86 \pm 5,15 \mu\text{M}$ e índice de seletividade maior que 7,46; e em relação ao CHIKV, CE_{50} de $88,46 \pm 4,24 \mu\text{M}$ e índice de seletividade maior que 6,40, indicando seletividade antiviral significativa. Já a **E-21** apresentou atividade frente ao OROV, com CE_{50} de $71,34 \pm 4,75 \mu\text{M}$ e índice de seletividade de 6,19. A **E-11** apresentou índices de seletividade superiores aos controles positivos (amantadina e ribavirina), destacando-se como candidata promissora ao desenvolvimento de novos fármacos antivirais. Os resultados obtidos reforçam a importância da triagem de compostos bioativos como estratégia inovadora para o enfrentamento das arboviroses.

Palavras-chave: arbovirus; derivados fenilpropanoides, Chikungunya virus; Zika virus; Mayaro virus; Oropouche virus; antiviral.

ABSTRACT

Arboviral diseases, including dengue, chikungunya, Mayaro fever, Zika, and Oropouche fever, represent a growing public health challenge in Brazil, with a marked increase in reported cases in recent years, particularly in the state of Minas Gerais. Despite the availability of some vaccines, there are still no specific antiviral therapies, and treatment remains limited to supportive care. In this context, the search for new molecules with therapeutic potential is essential. This study aimed to evaluate the cytotoxicity of 21 synthetic or modified eugenol derivatives in Vero cells by determining the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}). Their *in vitro* antiviral activity was assessed by determining the 50% effective concentration (EC_{50}) against *Chikungunya virus* (CHIKV), *Zika virus* (ZIKV), *Mayaro virus* (MAYV), and *Oropouche virus* (OROV) using the colorimetric MTT assay. The selectivity index (SI), calculated as the ratio between CC_{50} and EC_{50} , was used as a key parameter to evaluate the efficacy and safety of the tested compounds. A total of 21 compounds were evaluated, among which compound E-11 exhibited the most promising results. Against ZIKV, E-11 showed an EC_{50} of $38,23 \pm 5,55$ μ M and a selectivity index greater than 14,80. Against OROV, it exhibited an EC_{50} of $68,34 \pm 4,47$ μ M and a selectivity index greater than 8,28; against MAYV, an EC_{50} of $75,86 \pm 5,15$ μ M and a selectivity index greater than 7,46; and against CHIKV, an EC_{50} of $88,46 \pm 4,24$ μ M and a selectivity index greater than 6,40, indicating significant antiviral selectivity. Compound E-21 also demonstrated antiviral activity against OROV, with an EC_{50} of $71,34 \pm 4,75$ μ M and a selectivity index of 6,19. Notably, E-11 exhibited higher selectivity indices than the positive controls (amantadine and ribavirin), highlighting its potential as a promising candidate for the development of new antiviral drugs. These findings reinforce the importance of screening bioactive compounds as an innovative strategy for combating arboviral diseases.

Keywords: arboviruses; phenylpropanoid derivatives; Chikungunya virus; Zika virus; Mayaro virus; Oropouche virus; antiviral.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Índice de risco de impacto para arboviroses no Brasil (2017–2050).....	18
Figura 2 – Difusão do vírus da Zika no Brasil entre os anos 2014 e 2016.....	19
Figura 3 - Distribuição geográfica dos casos confirmados de febre Oropouche na Região das Américas, no ano de 2025, até a SE 30.....	22
Figura 4 - Cravo-da-Índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	23
Figura 5 – Núcleo fundamental dos fenilpropanóides.....	25
Figura 6 – Molécula do Eugenol	25
Figura 7 – Benzoxazol 16.....	26
Figura 8 – Derivados do eugenol 5a, 5x e 5y	27
Figura 9 – Medicamentos em uso clínico contendo o anel 1,2,3-triazol	30
Figura 10 – Derivados triazólicos da benzofenona: 4b, 4d, 4k, 5h e 5j	31
Figura 11 – Estruturas moleculares do Fluconazol, Ribavirina e Itraconazol.....	32
Figura 12 – Derivado paulownina triazol-cloroquinolina	33
Figura 13 – Atividade antiviral por inibição do efeito citopático do ZIKV, em células Vero, tratadas com a substância E-11 (56,7µM), 48 horas após infecção.....	54
Figura 14 – Atividade antiviral por inibição do efeito citopático do MAYV, em células Vero, tratadas com a substância E-11 (85,0µM).	55
Figura 15 – Atividade antiviral por inibição do efeito citopático do CHIKV, em células Vero, tratadas com a substância E-11 (99,11µM).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade (CC_{50}) nas células Vero e determinação da atividade da antiviral (CE_{50}) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, em linhagem celular Vero, com respectivos desvios padrões ($n=3$) e índice de seletividade (IS), das substâncias de síntese.....	46
Tabela 2 – Quantificação dos vírus após a avaliação do efeito citopático da substância E-11 contra ZIKV, CHIKV e MAYV	56
Tabela 3 – Quantificação dos vírus após a avaliação do efeito virucida da substância 11 contra ZIKV, CHIKV e MAYV.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantificação dos vírus (Log_{10} UFP/mL) ZIKV, CHIKV e MAYV, 48 horas após a infecção, no ensaio de inibição do efeito citopático da substância E-11 (UFP/mL).....57

Gráfico 2 – Quantificação dos vírus (Log_{10} UFP/mL) ZIKV, CHIKV e MAYV, após a avaliação da atividade virucida da substância E-11 (UFP/mL).....58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estruturas moleculares das 21 substâncias sintetizadas e testadas.....	35
---	----

LISTA DE SIGLAS

Å	Ångström
CC ₅₀	Concentração Citotóxica Média
CE ₅₀	Concentração Efetiva Média
CHIKV	Chikungunya virus
CAT	Catalase
CMC	Carboximetilcelulose
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DENV-1	Dengue virus sorotipo 1
DENV-2	Dengue virus sorotipo 2
DENV-3	Dengue virus sorotipo 3
DENV-4	Dengue virus sorotipo 4
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECP	Efeito citopático
GETV	Getah virus
GSH	Glutathione
HAV	Vírus da Hepatite A
HSV-1	Herpes simplex virus tipo 1
HSV-2	Herpes simplex virus tipo 2
IS	Índice de Seletividade
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada.
MAYV	Mayaro virus
MOI	Multiplicidade de infecção
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NA	Não ativo

NT	Não testado
ONNV	O'nyong-nyong virus
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OROV	Oropouche virus
PAL	Fenilalanina Amônia-Liase
PFU	Plaque Forming Units
PR	Potência Relativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RRV	Ross River virus
SFB	Soro Fetal Bovino
SFV	Semliki Forest
SOD	Superóxido dismutase
TCID ₅₀	Diluição de vírus exigida para infectar 50% da monocamada celular
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
UV	Ultravioleta
ZIKV	Zika virus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Arboviroses	16
2.1.1 ZIKV	18
2.1.2 CHIKV	20
2.1.3 MAYV	20
2.1.4 OROV	21
2.2 Cravo-da-índia na fitoterapia e seus constituintes ativos.....	23
2.3 Eugenol e seus derivados	24
2.3.1 Atividades Biológicas	25
2.3.1.1 Atividade Antiviral	25
2.3.1.2 Atividade Antioxidante e Anti-inflamatória	27
2.3.1.3 Atividade Fungicida.....	28
2.3.1.4 Atividade Anestésica e Antinociceptivo.....	28
2.3.1.5 Atividade Larvicida	28
2.3.1.6 Atividade Antimicrobiana.....	29
2.3.1.7 Atividade Anticancerígena	29
2.4 Derivados Triazólicos e suas atividades biológicas.....	30
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral:	34
4.2 Objetivos Específicos:	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Síntese dos Derivados do Eugenol.....	34
5.2 Ensaio Biológicos.....	37
5.3 Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral	38
5.3.1 Ensaio de citotoxicidade através método colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5- difenil brometo de tetrazolina (MTT).....	38
5.3.2 Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> pela técnica colorimétrica do MTT frente aos arbovírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV	39
5.3.2.1 Preparo das suspensões estoques virais	39
5.3.2.2 Determinação dos títulos infecciosos virais por TCID ₅₀	39
5.3.2.3 Avaliação da atividade antiviral pela técnica colorimétrica utilizando MTT	40
5.3.2.4 Análise estatística.....	42

5.3.2.5	Determinação do índice de seletividade para os compostos avaliados.....	42
5.3.2.6	Crítérios para avaliação da atividade citotóxica e antiviral	42
5.3.2.7	Ensaio antiviral por inibição do efeito citopático	43
5.3.2.8	Ensaio virucida	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1	Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral <i>in vitro</i>	45
6.2	Ensaio antiviral por inibição do efeito citopático	52
6.3	Ensaio Virucida.....	57
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9.	ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO	70

1.INTRODUÇÃO

Patógenos emergentes e reemergentes representam desafios globais para a saúde pública (GAO, 2018). No Brasil, doenças como dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika são de notificação compulsória e constam na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, conforme estabelecido pela Portaria GM/MS nº 5.201, de 15 de agosto de 2024, do Ministério da Saúde. Essas três enfermidades são classificadas como arboviroses e são transmitidas de pessoa a pessoa pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que se desenvolvem em áreas tropicais e subtropicais.

O Dengue vírus e o vírus Zika pertencem ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, genoma RNA, a mesma família dos vírus da encefalite, febre amarela e hepatite C. Assim como a maioria dos flavivírus, os vírus da dengue e o vírus Zika são transmitidos a hospedeiros vertebrados por mosquitos cronicamente infectados. No caso do Dengue vírus existem quatro tipos imunológicos: DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Já o Chikungunya e Mayaro vírus pertencem à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, genoma RNA, o mesmo gênero dos vírus o'nyong-nyong, Ross River e Barmah Forest (VU et al., 2017). O Oropouche vírus pertence à família *Peribunyaviridae*, do gênero *Orthobunyavirus*, da espécie *Orthobunyavirus oropoucheense*. A transmissão ocorre principalmente por insetos hematófagos, sendo o *Culicoides paraensis* considerado o principal vetor nas Américas, enquanto o *Culex quinquefasciatus* também pode estar envolvido no ciclo de infecção (OLIVEIRA et al., 2026).

O principal vetor da dengue e do zika é o *Aedes aegypti*, um mosquito amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais. Sua reprodução é favorecida por condições ambientais comuns, como o acúmulo de água parada, fator que impõe desafios adicionais às ações de controle (KINDHAUSER et al., 2016).

A dengue tem se consolidado como um dos maiores desafios globais de saúde pública, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Nas formas graves da doença, podem ocorrer manifestações clínicas como extravasamento de plasma, que evolui para choque, acúmulo de líquidos em cavidades corporais levando à insuficiência respiratória, além de hemorragias intensas ou sinais de falência de múltiplos órgãos (PAGLIARI et al., 2026).

O vírus da Zika foi identificado pela primeira vez em primatas na floresta Zika, em Uganda, em 1947, com os primeiros casos humanos registrados na Nigéria em 1954.

Posteriormente, espalhou-se por outras regiões, como a Oceania (2007) e a Europa (França, 2013), chegando ao Brasil em 2015, com notificações nos estados do Rio Grande do Norte e Bahia.

A infecção por CHIKV é marcada por febre alta, dores articulares intensas e debilitantes, além de sintomas como cefaléia e mialgia. Diferentemente da Dengue, destaca-se a manifestação de poliartrite/artralgia simétrica, comumente nos punhos, tornozelos e cotovelos, que pode persistir por semanas ou até meses após o desaparecimento da febre (DONALISIO et al., 2014; FREITAS et al., 2014).

Já o MAYV é o agente etiológico da febre Mayaro, uma doença com sintomas clínicos inespecíficos que se confundem facilmente com outras arboviroses. Predomina em áreas tropicais da América Central e América do Sul, sendo considerada uma enfermidade negligenciada, pela escassez de dados epidemiológicos e estudos aprofundados sobre sua fisiopatologia (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014).

No Brasil, o OROV foi identificado pela primeira vez em 1960, durante a construção da rodovia Belém–Brasília, a partir da análise de sangue de uma preguiça (*Bradypus trydactylus*). Posteriormente, também foi detectado em um agrupamento de mosquitos *Ochlerotatus serratus* coletados na mesma localidade (PINHEIRO et al., 1962). Entre as décadas de 1960 e 1980, o OROV esteve associado a várias epidemias no estado do Pará, ocasionando cerca de 11 mil infecções humanas. Esses surtos afetaram diversas mesorregiões da área metropolitana de Belém, com exceção da porção sudoeste do estado (PINHEIRO et al., 1962).

Frente à ausência de terapias antivirais específicas para essas arboviroses, o desenvolvimento de moléculas capazes de interferir na replicação viral tem se tornado uma estratégia promissora. Os antivirais atuam bloqueando a entrada do vírus na célula hospedeira, inibindo enzimas essenciais à sua replicação ou impedindo a síntese de seu genoma. No entanto, para que esses compostos apresentem eficácia seletiva, é fundamental que seus alvos moleculares sejam específicos do vírus, evitando efeitos sobre processos celulares humanos semelhantes (BRANDÃO et al., 2013; CROON et al., 2013; SOUZA et al., 2013; FILHO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

A inovação farmacêutica constitui um campo dinâmico e essencial para a saúde pública, e nesse contexto o eugenol tem despertado crescente interesse como candidato a agente antiviral. Assim como o eugenol, compostos fenólicos naturais, incluindo naringenina, crisina, quercetina e seus derivados glicosídicos, têm demonstrado atividade significativa *in vitro* contra diferentes arbovírus. Esses metabólitos secundários atuam em etapas críticas do ciclo viral,

como adsorção, entrada celular e replicação, apresentando índices de seletividade satisfatórios em culturas de células (AHMADI et al., 2016). A relação entre essas substâncias e o eugenol reside no fato de todos serem derivados fenólicos com capacidade de modular processos oxidativos e inflamatórios, além de interagir com proteínas virais e receptores celulares. Essa semelhança estrutural e funcional reforça o potencial do eugenol como ponto de partida para a síntese de novos derivados com atividade antiviral ampliada.

Esses compostos também evidenciaram capacidade de inibir proteases virais como NS2B-NS3 frente ao ZIKV (SAIVISH et al., 2023) e nsP3/nsP4 frente ao CHIKV e MAYV. Portanto, explorar sinteticamente ou modificar racionalmente esses núcleos fenilpropanoides representam uma estratégia promissora para desenvolver novos antivirais eficazes contra as arboviroses.

Atualmente, apenas medicamentos e intervenções auxiliam no alívio dos sintomas. A utilização de produtos à base de óleos essenciais representa uma alternativa terapêutica promissora, caracterizada por eficácia potencial, baixo custo e menor toxicidade. Além disso, quando esses óleos são extraídos de plantas tradicionalmente empregadas pela população, há maior aceitação cultural, o que favorece a adesão ao tratamento e, conseqüentemente, aumenta as chances de sucesso terapêutico. No caso do cravo-da-índia, destaca-se a elevada concentração de óleo essencial em seus botões florais, dos quais cerca de 15 a 20% correspondem ao eugenol (ABREU PEREIRA et al., 2024).

Dessa forma, o eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) é um composto aromático pertencente ao grupo dos fenóis, também conhecido como 4-alil-2-metoxifenol segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC).

O eugenol foi testado contra o vírus herpes simplex (HSV-1), o vírus da hepatite A (HAV) e um adenovírus. Observou-se maior efeito antiviral frente ao HAV, baixa seletividade para o HSV-1 e ausência de atividade contra o adenovírus, sendo escassos os dados na literatura sobre a ação de óleos essenciais no HAV (ULANOWSKA et al., 2021)

No âmbito de pesquisas correlatas, Silva (2021) conduziu um estudo voltado à síntese de novos derivados do eugenol incorporando fragmentos 1,2,3-triazólicos, com o objetivo de investigar seu potencial antiviral contra os vírus ZIKV e CHIKV. Entre os 26 compostos avaliados, quatro demonstraram atividade significativa frente ao ZIKV e um frente ao CHIKV, evidenciando a viabilidade desses derivados como candidatos promissores para o desenvolvimento de agentes antivirais.

Dessa forma, no presente estudo, o eugenol foi adotado como estrutura de referência

para a síntese e/ou prospecção de novos derivados, cuja síntese foi realizada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Guilherme Rocha Pereira da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG), com o intuito de identificar compostos derivados do eugenol com potencial atividade antiviral *in vitro* frente aos vírus ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arboviroses

As arboviroses constituem um conjunto de doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e, em alguns casos, carrapatos. Essas enfermidades podem causar desde sintomas leves até manifestações graves, potencialmente fatais. Entre os principais vetores destacam-se mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, além de outros artrópodes hematófagos que atuam como vetores de vírus do gênero *Orthobunyavirus*, adquirindo o vírus durante o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados (BRASIL, 2026). No Brasil, enfermidades como dengue, zika, chikungunya e febre amarela destacam-se pela elevada frequência de casos e pela capacidade de desencadear surtos epidêmicos, resultando em impacto expressivo na morbidade e mortalidade da população (FERNANDES et al., 2024).

As arboviroses apresentam caráter endêmico em diversos países e, no contexto brasileiro, a dengue continua sendo a infecção de maior ocorrência. Esses vírus têm representado, ao longo dos anos, um alerta constante para a saúde pública, impactando de forma significativa tanto a sociedade quanto a economia. Além do elevado potencial de se tornarem endêmicas, essas doenças se destacam pela dificuldade no controle dos vetores e pela inexistência de tratamentos antivirais específicos e efetivos (PEPE et al., 2020).

Apesar da existência de vacinas licenciadas contra a dengue, como a Dengvaxia®, seu uso sempre foi restrito a indivíduos previamente infectados, devido ao risco aumentado de formas graves em pessoas soronegativas. Fatores como custo elevado, necessidade de testagem prévia e limitações logísticas também dificultaram sua ampla implementação em países endêmicos. No Brasil, a vacina foi oficialmente descontinuada em 2025 pela fabricante, em razão da baixa demanda comercial (SANOFI, 2025), o que reforça os desafios na adoção de estratégias vacinais contra a dengue.

Como destacam Anumanthan, Sahay e Mergia (2025), “o desenvolvimento de uma vacina contra a dengue enfrenta desafios relacionados à segurança, eficácia, entrega e

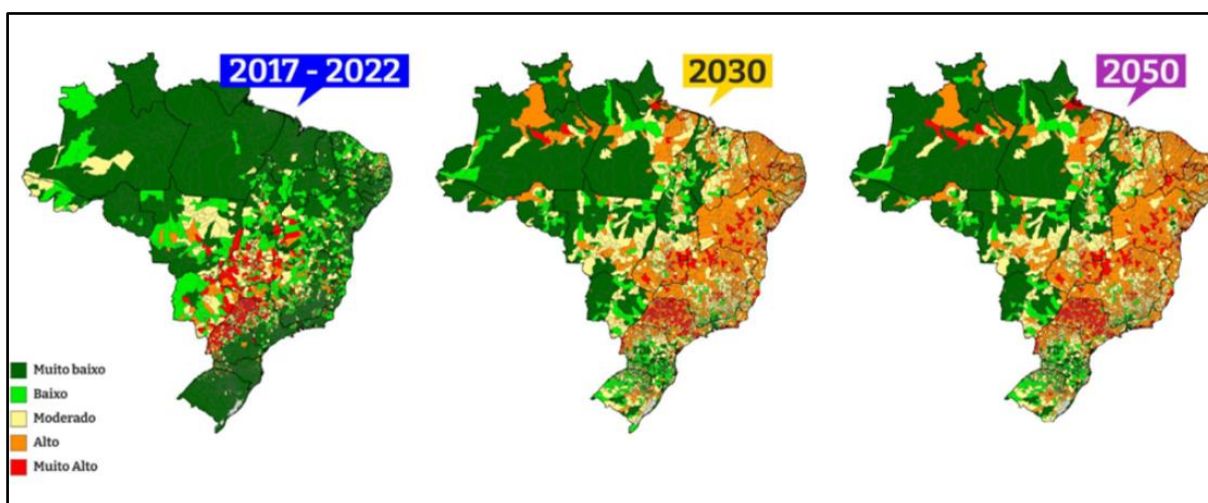
disponibilidade”. Além disso, outras arboviroses de grande impacto, como Zika, Chikungunya, Mayaro e Oropouche ainda não possuem vacinas disponíveis, mantendo a população vulnerável e reforçando a necessidade urgente de estratégias inovadoras de prevenção e desenvolvimento de novos agentes antivirais.

O Brasil, por estar situado em região tropical, reúne fatores ambientais favoráveis à manutenção e expansão dos mosquitos transmissores, como altas temperaturas e acúmulo de água parada, o que intensifica a circulação viral (LOPES et al., 2014). As complicações associadas às arboviroses, sobretudo aquelas que acometem o sistema nervoso, configuram um grande desafio para o diagnóstico e a condução terapêutica. Em regiões endêmicas, diante de casos suspeitos, deve-se considerar manifestações como encefalite, mielite, encefalomielite, polirradiculoneurite ou outras síndromes que acometem o sistema nervoso central ou periférico, quando não há outra causa evidente (PUCCIONI-SOHLER et al., 2023).

No estudo de Lima-Camara (2016), são discutidos também diversos fatores que contribuem para a disseminação abundante das arboviroses no Brasil, como a alteração do ecossistema pelo homem, o crescimento urbano desordenado, a globalização, o aumento da translocação internacional e as mudanças climáticas. Esses elementos favorecem a expansão dos vetores e, conseqüentemente, elevam o risco de emergência ou reemergência de doenças. Além disso, o movimento voluntário de pessoas para diferentes regiões, seja por questões pessoais, trabalho ou desastres naturais, intensifica os riscos de propagação e dificulta o controle epidemiológico.

De forma complementar, o artigo de revisão de Machado et al. (2025) destaca que as arboviroses no Brasil são marcadas por um cenário dinâmico, em que diferentes vírus coexistem e alternam períodos de predominância. Essa alternância epidemiológica exige da saúde pública não apenas ações imediatas de contenção, mas também estratégias de longo prazo, considerando as comorbidades e complicações neurológicas que essas doenças podem provocar. Os autores enfatizam ainda os impactos sociais e econômicos das epidemias, ressaltando que populações socialmente vulneráveis tendem a perder mais anos de vida em decorrência dessas infecções, evidenciando desigualdades estruturais no enfrentamento das arboviroses. Conforme dados retirados do AdaptaBrasil – NCTI (2025) representados pela figura 1, observa-se um aumento progressivo do risco de impacto para arboviroses nas regiões Norte e Nordeste até 2050, associado a fatores climáticos e socioambientais.

Figura 1 – Índice de risco de impacto para arboviroses no Brasil (2017–2050)



O risco considera indicadores climáticos, como temperatura e precipitação, e fatores relacionados à vulnerabilidade dos municípios para essas doenças, como densidade populacional e densidade municipal de rodovias, ocorrência de favelas e de desmatamento, além do percentual de domicílios sem acesso à coleta de lixo, com abastecimento de água alternativa e uso de cisternas.”

Fonte: Adaptado de Agência Pública (2025), com dados do AdaptaBrasil – MCTI.

O *Aedes aegypti*, origem africana, é o vetor das arboviroses que mais se destaca. Essa espécie é o principal vetor dos quatro sorotipos virais da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e também, atua na transmissão de outras viroses, como, Chikungunya e Zika (SILVA et al., 2024).

2.1.1 ZIKV

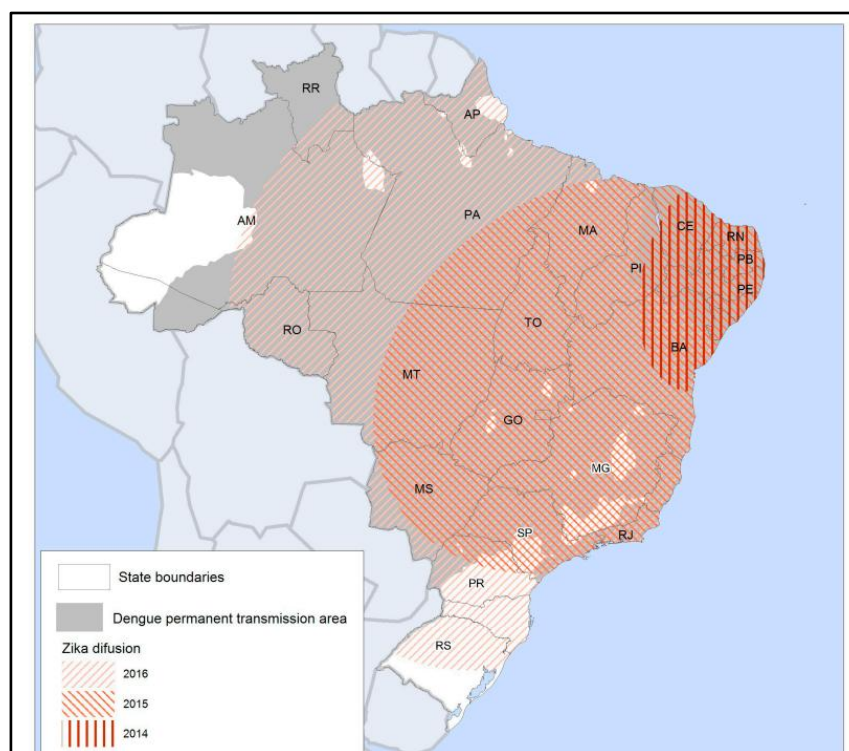
A infecção pelo *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) pode ser assintomática ou sintomática, com início dos sintomas geralmente entre 3 e 12 dias após a picada do inseto. De acordo com o Ministério da Saúde, as manifestações mais comuns incluem febre em torno de 38,5°C ou ausente, exantema, conjuntivite não purulenta, cefaleia, artralgia, astenia, mialgia, edema periarticular e linfonodomegalia. Em casos mais graves, podem ocorrer complicações neurológicas, como mielite, neuropatia e a Síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune em que o sistema imunológico ataca o sistema nervoso, provocando inflamação, fraqueza muscular e arreflexia. Estudos recentes apontam que mais de 50% dos pacientes infectados tornam-se sintomáticos (BRASIL, 2024).

O surto de Zika no Brasil teve início em 2014, com confirmação laboratorial em 2015, e rapidamente se espalhou pelo território nacional como apresentado na figura 2. Segundo Lowe

et al. (2018), em poucos meses a infecção atingiu quase todos os estados, exceto áreas remotas da Amazônia e a porção mais ao sul do país, onde as condições climáticas não favoreciam a presença do vetor. Diferentemente dos quatro sorotipos da dengue, que levaram décadas para se disseminar, o Zika ultrapassou os limites da área de transmissão permanente da dengue, expandindo-se para regiões sem circulação sustentada do *Aedes aegypti*. Essa rápida difusão foi atribuída a fatores como alta suscetibilidade populacional, condições climáticas favoráveis, rotas alternativas de transmissão não vetorial e intensa mobilidade populacional.

Em 2016, a epidemia já havia alcançado praticamente todo o país, com elevada soroprevalência em áreas como Salvador, onde se estimou que 63% da população havia sido exposta ao vírus. Posteriormente, observou-se uma queda expressiva nos casos, passando de 205.578 notificações em 2016 para 13.353 em 2017, atribuída principalmente ao desenvolvimento de imunidade populacional Lowe et al. (2018).

Figura 2 – Difusão do vírus da Zika no Brasil entre os anos 2014 e 2016



Fonte: Lowe et al. (2018)

No Brasil, nos anos seguintes, os registros epidemiológicos confirmaram essa tendência de declínio. Em 2023, foram contabilizados 6.604 casos prováveis de infecção por ZIKV, com 1 óbito. Em 2024, houve redução para 5.114 casos, sem óbitos. Em 2025, foram notificados

3.697 casos e 1 óbito. Já em 2026, até março, registraram-se 1.207 casos prováveis e nenhum óbito, evidenciando a manutenção da queda no número de casos quando comparado ao mesmo período dos anos anteriores (BRASIL, 2026).

2.1.2 CHIKV

Na Chikungunya, os principais vetores que apresentam enorme grau de transmissão são o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, demonstrando ser uma grande ameaça ao país. Houve o primeiro registro de caso em território brasileiro em Oiapoque, localizado no Amapá, no ano de 2014 e, nos dias atuais, Amapá, Bahia e Pernambuco são os locais que apresentam alto índice de transmissão desses arbovírus (LIMA-CAMARA, 2016).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, em 2023, ocorreu uma dispersão territorial dos casos de Chikungunya, com maior concentração na região Nordeste, mas já com registros significativos na região Sudeste. Os sintomas mais comuns da enfermidade incluem cefaleia, febre alta ($>38^{\circ}\text{C}$), dor ocular, artralgia, náuseas, vômitos, exantema e mialgia intensa. A evolução clínica pode ocorrer em três fases: a fase febril ou aguda, com duração de 5 a 14 dias; a fase pós-aguda, entre 15 e 90 dias; e a fase crônica, considerada a mais grave, na qual os sintomas persistem por mais de 90 dias. Além disso, há relatos de transmissão vertical do CHIKV durante o parto, resultando em infecções neonatais graves.

No ano de 2024 houve 263.502 casos prováveis notificados, 246 óbitos confirmados e 55 em investigação, ou seja, quando comparado aos dados epidemiológicos do ZIKV, apresentou maior incidência. Em 2025, houve 126.930 casos prováveis, 125 óbitos notificados e 41 óbitos ainda em investigação. No ano de 2026 até o dia 2 de maio houve 39.816, 22 óbitos por CHIKV e 19 em investigação, havendo uma diminuição nos casos quando comparado ao ano anterior (BRASIL, 2026).

2.1.3 MAYV

O vírus Mayaro é um arbovírus envelopado, constituído por RNA de fita simples de polaridade positiva. Ele integra a família *Togaviridae* e o gênero *Alphavirus*, grupo que também inclui o CHIKV. A fisiopatologia da febre Mayaro permanece pouco elucidada, mas sabe-se que provoca um quadro febril agudo, geralmente acompanhado de cefaleia e artralgias intensas (OLIVEIRA et al., 2024)

Quando é realizado o teste sorológico na identificação de *Alphavirus*, é necessário se ter muito cuidado durante a interpretação dos resultados, pois há a possibilidade de haver reação cruzada com outros membros do complexo antigênico SemlikiForest (SFV) (BRASIL, 2022). Além do CHIKV e MAYV, são membros deste complexo os vírus *Alphavirus rossriver* (RRV), *Alphavirus onyong* (ONNV) e *Alphavirus getah* (GETV) (NGUYEN et al., 2020).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, o vírus Mayaro foi isolado pela primeira vez em Trinidad, em 1954, e o primeiro surto no Brasil foi descrito em 1955, às margens do rio Guamá, próximo de Belém, estado do Pará, e desde então casos esporádicos são notificados, principalmente no Norte e Centro-Oeste. Alguns dos sintomas comuns manifestados durante a infecção por MAYV são febre, entre 39 e 40°C, dores de cabeça, artralgia, edemas articulares, calafrios, geralmente manifestados durante a fase aguda inicial da doença, podendo persistir durante 1 a 2 semanas. O indivíduo é considerado suspeito de estar infectado por MAYV quando houve a apresentação de febre e artralgia e/ou edema articular, acompanhado de cefaleia, mialgia e/ou exantema, com exposição nos últimos 15 dias (ou moradia) em área silvestre, rural ou de mata, em todo o território nacional.

Registros recentes apontam para um aumento no número de casos quando comparados a anos anteriores. De acordo com notícia publicada pelo canal G1 em 28 de maio de 2025, até o mês de maio já haviam sido confirmados 11 casos de infecção por MAYV no Acre, enquanto em 2024 haviam sido notificados apenas 4 casos no mesmo período, evidenciando uma tendência de crescimento e a importância de intensificar a vigilância epidemiológica e os estudos sobre essa arbovirose (G1, 2025).

2.1.4 OROV

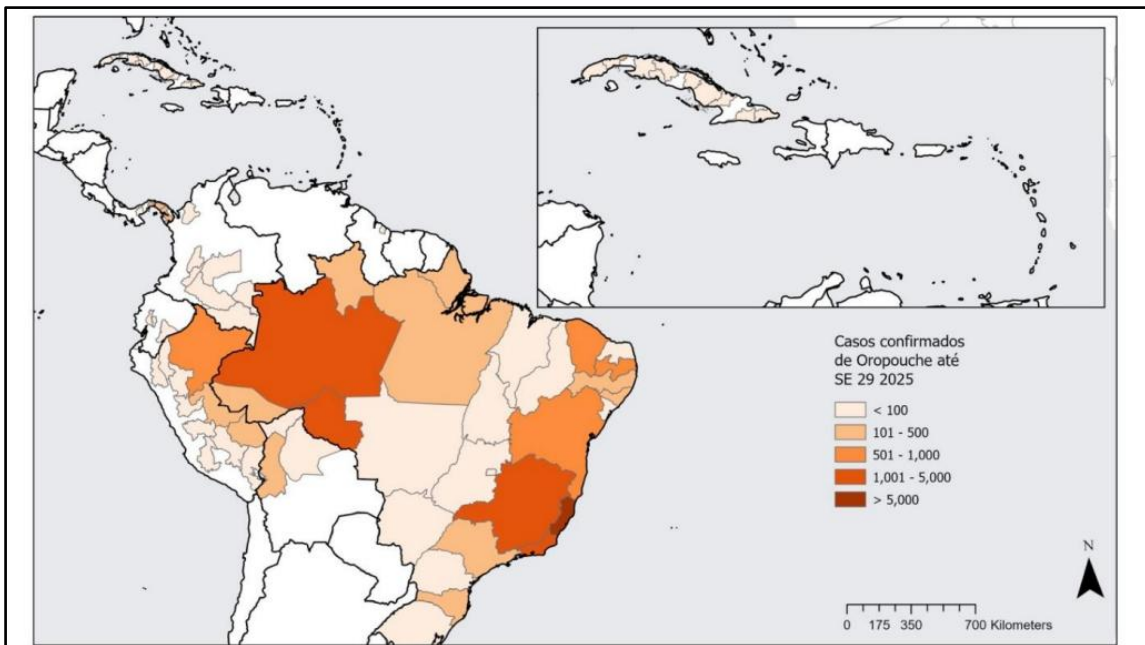
No OROV, os sintomas apresentam-se de forma semelhante aos da dengue, incluindo manifestações como cefaleia intensa, dores musculares, náuseas e diarreia. A transmissão pode ocorrer em dois ciclos distintos: no silvestre, atuam como hospedeiros preguiças e primatas não humanos (além de aves e roedores silvestres); já no urbano, o ser humano é o principal hospedeiro, tendo o *Culicoides paraensis* como vetor predominante (BRASIL, 2022)

Em termos epidemiológicos, observa-se uma oscilação no número de casos confirmados nos últimos anos em território brasileiro. Em 2024, foram registrados 14.630 casos e 4 óbitos. No ano seguinte, 2025, até o mês de agosto, contabilizaram-se 12.670 casos e 7 óbitos. Já em 2026, até 13 de março, foram confirmados apenas 10 casos, sem registro de óbitos (BRASIL,

2026). Apesar do grande impacto na América do Sul, especialmente na Região Amazônica, os casos de OROV e MAYV permanecem negligenciados e frequentemente subnotificados. Essa situação é agravada pelas epidemias recorrentes, que dificultam a detecção devido à semelhança clínica entre essas arboviroses e outras doenças infecciosas prevalentes no Brasil (OLIVEIRA et al., 2024).

Adicionalmente, em relação ao último boletim epidemiológico apresentado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), assim como mostra a figura 3, publicado em agosto do ano de 2025, entre as semanas epidemiológicas (SE) 1 e 30, foram notificados 12.786 casos confirmados de febre Oropouche na Região das Américas. Esses registros ocorreram em 11 países: Brasil (11.888 casos, incluindo cinco óbitos), Canadá (1 caso importado), Chile (2 casos importados), Colômbia (26 casos), Cuba (28 casos), Guiana (1 caso importado), Panamá (501 casos, incluindo um óbito), Peru (330 casos), Estados Unidos da América (1 caso importado), Uruguai (3 casos importados) e Venezuela (5 casos) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2025) .

Figura 3 - Distribuição geográfica dos casos confirmados de febre Oropouche na Região das Américas, no ano de 2025, até a SE 30



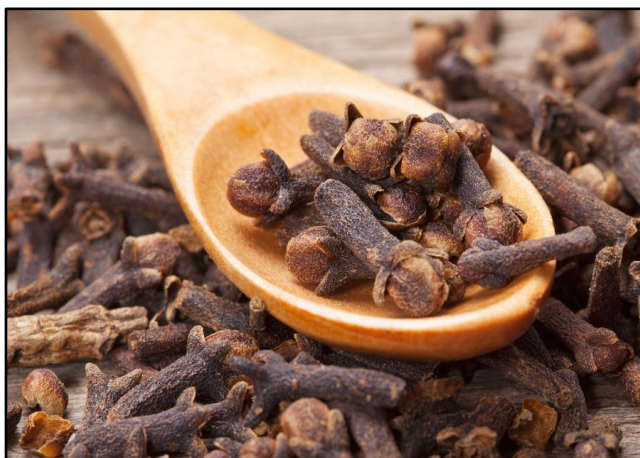
Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde (2025)

2.2 Cravo-da-índia na fitoterapia e seus constituintes ativos

O cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), apresentado na figura 4, também conhecido como *Eugenia caryophyllata* L., é uma árvore perene da família Myrtaceae, cultivada em regiões tropicais e utilizada há mais de dois milênios na medicina tradicional chinesa e ayurvédica. Os botões florais secos, popularmente chamados de “cravos”, são empregados em diferentes formas, pó ou óleo essencial, como especiaria, e apresentam propriedades bioativas relevantes. Estudos destacam que o óleo essencial possui maior potência farmacológica, principalmente devido ao eugenol, composto majoritário do óleo essencial. O cravo também se mostra fonte de minerais como magnésio, potássio, ferro e selênio, além de vitaminas A, C, K e do complexo B, reforçando sua importância nutricional e medicinal (VICIDOMINI; ROVIELLO; ROVIELLO, 2021).

Além disso, o cravo-da-índia é reconhecido como uma das principais fontes vegetais de compostos fenólicos, destacando-se o ácido gálico e seus derivados, bem como flavonoides como kaempferol e quercetina. Os botões florais podem conter até 18% de óleo essencial, composto majoritariamente por eugenol, mas também por acetato de eugenol, β -cariofileno e α -humuleno, além de outros voláteis em menor concentração, responsáveis pelo aroma característico da especiaria (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014).

Figura 4 - Cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*)



Fonte: Pharma Scalabis (2025)

2.3 Eugenol e seus derivados

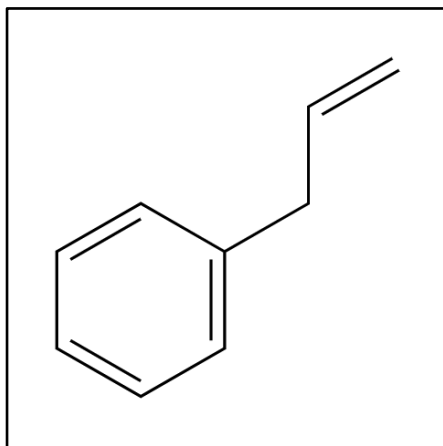
O eugenol e seus derivados pertencem ao grupo dos fenilpropanoides, compostos originados do ácido transcinâmico, formado a partir da fenilalanina por meio da reação catalisada pela enzima Fenilalanina Amônia-Liase (PAL) (SILVA; RAMOS, 2011). Sua fórmula molecular é $C_{10}H_{12}O_2$, sendo denominado pela IUPAC como 4-alil-2-metoxifenol. De acordo com Ulanowska e Olas (2021), o eugenol e seus derivados podem ser obtidos a partir de óleos essenciais naturais de plantas das famílias Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Myristicaceae, constituindo o principal componente do óleo essencial do cravo-da-índia. Entre as diferentes partes da planta, a flor apresenta a maior concentração de eugenol, quando comparada às folhas, caule ou sementes.

O eugenol apresenta-se como um líquido de coloração transparente a amarelo claro, de consistência oleosa e odor picante. Ademais, esse composto apresenta baixa estabilidade química, tornando-o mais propício a oxidar e a sofrer interações químicas, tornando a administração por via oral mais efetiva quando há a encapsulação do eugenol, evitando assim o metabolismo de primeira passagem (ULANOWSKA; OLAS, 2021).

Como complemento, Nisar et al. (2021) acrescentaram que as principais fontes naturais de eugenol são o cravo-da-índia e a canela. O óleo essencial do cravo-da-índia pode conter entre 45% e 90% de eugenol, enquanto o da canela apresenta teores entre 20% e 50%, dependendo da espécie vegetal, da origem e do método de extração. Entretanto, essas fontes são consideradas de maior custo para a obtenção do composto. Fontes de menor custo para obtenção de eugenol incluem o gengibre, manjerição e o louro. Ademais, pode ser preparado sinteticamente, através da alilação do guaiacol com cloreto de alila ou produzido por meio do processo de biotransformação que envolve microrganismos como *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp.* e *Bacillus cereus*.

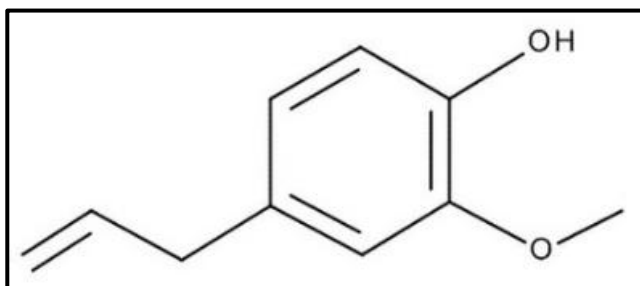
As figuras 5 e 6 apresentam a estrutura química do núcleo dos fenilpropanóides e da molécula do eugenol.

Figura 5 – Núcleo fundamental dos fenilpropanóides



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 6 – Molécula do Eugenol



Fonte: Elaborada pela autora.

Há diversos estudos dessa substância que relacionam as atividades antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antimicrobiana, anestésica, anticancerígena, antiviral e até larvicida em diferentes modelos experimentais (ULANOWSKA; OLAS, 2021; CRUZ, 2024).

2.3.1 Atividades Biológicas

2.3.1.1 Atividade Antiviral

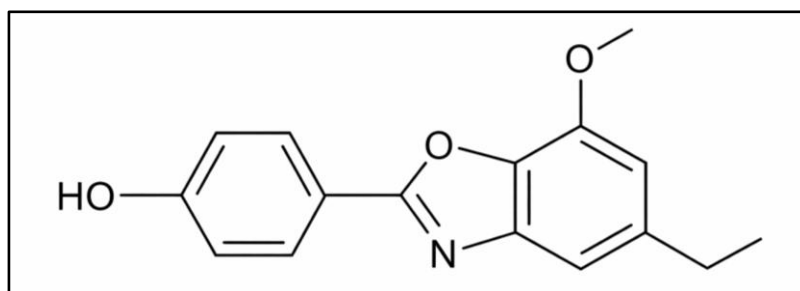
O eugenol revelou possuir atividade antiviral de amplo alcance, atuando contra diferentes tipos de vírus (CHEN et al., 2025). Estudos recentes demonstraram que o óleo essencial obtido das partes aéreas de *Pimenta racemosa* apresenta atividade frente ao Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) e atividade moderada contra o Herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2), tendo como principal constituinte o eugenol (34,85%), além de β -pineno, linalol e limoneno.

O óleo exibiu elevado índice de seletividade contra o HSV-1 ($IS = 34,79$) e atividade virucida associada à inativação do envelope lipídico viral. Frente ao HSV-2, observou-se atividade moderada ($IS = 1,63$), evidenciando o potencial farmacológico do eugenol e de compostos fenólicos relacionados como candidatos ao desenvolvimento de novos agentes antivirais (ELSHAARAWY et al., 2024).

Esses resultados reforçam a importância dos compostos naturais contendo núcleos fenólicos na prospecção de moléculas bioativas contra infecções virais. Ademais, o eugenol destaca-se como um composto natural de grande interesse para manipulação química, devido à sua ampla gama de atividades biológicas, incluindo ação antiviral. Além disso, seus derivados semissintéticos também apresentam relevância significativa (PÉRET et al., 2025).

De modo análogo ao presente estudo, Péret et al. (2025) descreveram a síntese de benzoxazóis derivados de eugenol e análogos, avaliados frente ao CHIKV, ZIKV e MAYV. Entre os compostos obtidos, o benzoxazol 16, apresentado na figura 7, apresentou elevada eficácia antiviral contra o CHIKV e promoveu redução expressiva da carga viral do ZIKV em ensaios *in vitro*, evidenciando seu potencial como candidato ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Figura 7 – Benzoxazol 16

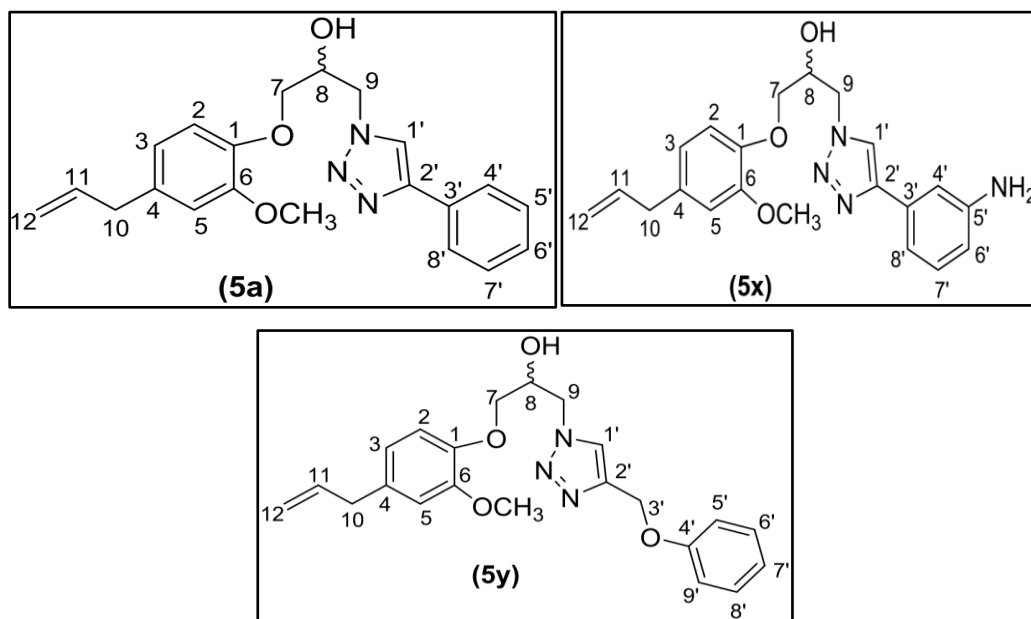


Fonte: Adaptado de Péret et al. (2025)

Em outra investigação, Nunes et al. (2022) sintetizaram vinte e seis derivados do eugenol contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos e avaliaram sua atividade frente aos vírus Chikungunya e Zika. Apenas um derivado (5a) apresentou atividade contra o CHIKV, com CE_{50} de $135,69 \mu\text{mol/L}$, embora o índice de seletividade ($IS < 1$) tenha indicado baixa segurança para aplicação celular. Em contrapartida, frente ao ZIKV, sete derivados demonstraram atividade antiviral, destacando-se os compostos 5x ($CE_{50} = 63,52 \mu\text{mol/L}$; $IS = 5,40$) e 5y (CE_{50}

= 84,29 $\mu\text{mol/L}$; IS = 5,11), evidenciando que modificações estruturais do eugenol podem aumentar sua seletividade e eficácia antiviral. A figura 8 apresenta as estruturas químicas dos derivados triazólicos do eugenol 5a, 5x e 5y.

Figura 8 – Derivados do eugenol 5a, 5x e 5y



Fonte: Adaptado de Nunes et al. (2022)

Em conjunto, esses estudos demonstram que o eugenol e seus derivados constituem uma classe promissora de moléculas para o desenvolvimento de novos antivirais. Entretanto, ainda são limitadas as investigações envolvendo derivados fenólicos frente aos arbovírus CHIKV, ZIKV, MAYV e OROV, reforçando a necessidade de estudos voltados à síntese racional e à avaliação biológica de novos compostos com potencial aplicação terapêutica.

2.3.1.2 Atividade Antioxidante e Anti-inflamatória

Nesse contexto, o eugenol se destaca como um dos compostos fenólicos mais promissores devido às suas atividades antioxidante e anti-inflamatória. Os autores ressaltaram que o eugenol atua modulando vias de sinalização celular, como NF- κ B e Nrf2, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e estimulando enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione (GSH). Esses mecanismos explicam sua capacidade de proteger tecidos contra processos

inflamatórios e o estresse oxidativo, com aplicações potenciais em doenças articulares, pulmonares, hepáticas, neurológicas e metabólicas. O estudo conclui que a dupla ação anti-inflamatória e antioxidante do eugenol, aliada à sua ampla disponibilidade, reforça sua relevância como candidato para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas em condições relacionadas ao desequilíbrio redox e à inflamação (DAMASCENO et al., 2024).

2.3.1.3 Atividade Fungicida

De forma semelhante, Oliveira-Júnior et al. (2025) investigaram a atividade do eugenol frente a cepas de *Candida parapsilosis* isoladas a partir da coleta da cavidade oral de 20 indivíduos clinicamente saudáveis, sem presença de candidíase oral ou outras alterações bucais. Os testes realizados *in vitro* demonstraram que o eugenol foi eficaz contra todas as cepas analisadas, apresentando efeito fungicida, inibindo fatores de virulência e mostrando desempenho superior à nistatina nas condições avaliadas.

2.3.1.4 Atividade Anestésica e Antinociceptivo

Aréchiga-Palomera et al. (2024) avaliaram os efeitos anestésicos do óleo de cravo e da lidocaína em *Dormitator latifrons*, demonstrando que o eugenol é uma alternativa viável como anestésico por apresentar baixo custo, baixa toxicidade e baixa bioacumulação nos tecidos. O cravo-da-índia é utilizado como agente antinociceptivo desde o século XIII, especialmente para dor de dente, dor articular e como antiespasmódico. O mecanismo de ação associado a essa atividade envolve a ativação de canais de cálcio e cloreto em células ganglionares (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Essas evidências reforçam o papel do eugenol como principal responsável pelas propriedades analgésicas e anestésicas do cravo-da-índia.

2.3.1.5 Atividade Larvicida

No campo de saúde pública, Cruz et al. (2024) analisaram a atividade larvicida e a composição química de quatro óleos essenciais contra o *Aedes aegypti*, vetor de arboviroses como Dengue, Zika e Chikungunya. Entre os constituintes identificados, destacou-se o eugenol. Os resultados mostraram que os óleos ricos em eugenol apresentaram alta toxicidade larvicida, provocando mortalidade significativa das larvas em baixas concentrações. Esse estudo é de

extrema importância, pois apresenta efetividade pré-contaminação, uma abordagem a qual busca interromper precocemente o ciclo de vida do mosquito, impedindo que as formas imaturas alcancem a fase adulta e, consequentemente, reduzindo a população vetorial responsável pela transmissão de arboviroses.

2.3.1.6 Atividade Antimicrobiana

Pesquisas recentes têm explorado estratégias de nanoformulação para potencializar a atividade antimicrobiana do eugenol. Hassan et al. (2025) demonstraram que a preparação de nanoemulsões por emulsificação espontânea resultou em maior estabilidade físico-química e incremento da atividade antimicrobiana frente a diferentes microrganismos com potencial de patogenicidade. Os autores destacaram que a nanoemulsão de eugenol apresentou melhor dispersão em meio aquoso e maior capacidade de interação com membranas celulares, o que explica sua superioridade em relação ao composto livre. Esses resultados reforçam a importância de abordagens nanotecnológicas na valorização de moléculas naturais, ampliando suas aplicações farmacêuticas e alimentares.

De modo complementar, Prado et al. (2025) relataram que o fenilpropeno eugenol promoveu elevada redução da sobrevivência de *Salmonella enterica* quando comparado a outros compostos presentes em óleos essenciais, evidenciando o potencial biológico de estruturas contendo núcleos fenólicos e fenilpropanoides. Segundo os autores, a atividade antimicrobiana do eugenol está associada à interação dos grupos hidroxila com a membrana celular microbiana, resultando em alterações de permeabilidade e consequente lise celular.

2.3.1.7 Atividade Anticancerígena

De forma global, o câncer é reconhecido como a segunda principal causa de mortes no mundo, caracterizando-se pela formação de células anômalas que se replicam de maneira descontrolada e podem migrar para outros tecidos do corpo. Nesse contexto, o eugenol tem despertado grande interesse científico por suas propriedades anticancerígenas, demonstrando atividade frente a diversos tipos de câncer, como pulmão, pele, leucemia, mama, cólon e fígado. Estudos recentes evidenciam que esse composto fenólico atua modulando múltiplas vias de sinalização celular envolvidas na carcinogênese, como NF- κ B, PI3K/Akt e MAPK, além de induzir apoptose e inibir a proliferação tumoral (WADOOD et al., 2024).

Zari, Zari e Hakeem (2021) destacam ainda que o eugenol apresenta capacidade de reduzir a angiogênese, limitar a invasão e metástase de células malignas e aumentar a sensibilidade tumoral a agentes quimioterápicos. Essas evidências reforçam o potencial do eugenol como candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra diferentes tipos de câncer.

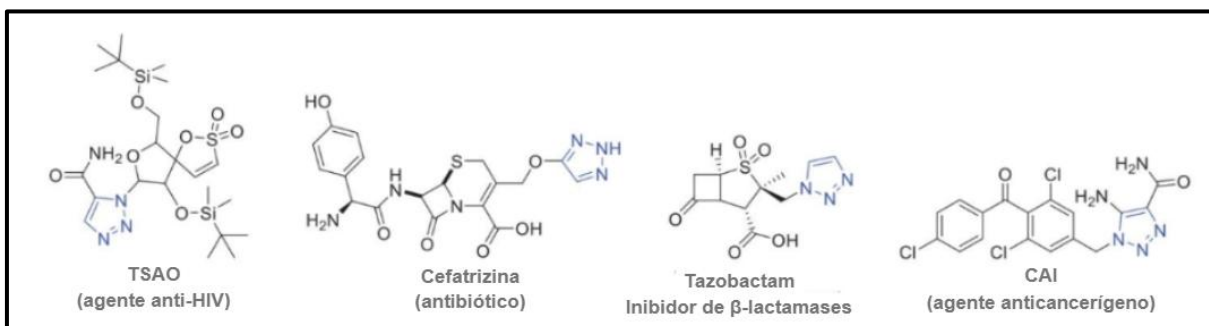
2.4 Derivados Triazólicos e suas atividades biológicas

Os triazóis são heterociclos de cinco membros, constituídos por dois átomos de carbono e três de nitrogênio, com fórmula molecular $C_2H_3N_3$. Podem ser encontrados nas formas isoméricas 1,2,3-triazol e 1,2,4-triazol, também conhecidos como pirro-diazóis. Fisicamente, apresentam-se como cristais de coloração branca a amarelo-pálida, de odor suave, solúveis em água e álcool, com pontos de fusão em torno de 120 °C e 260 °C (MATIN et al., 2022).

Essa classe de compostos possui grande relevância na química medicinal, em razão de suas múltiplas aplicações biológicas já descritas, incluindo atividades anticonvulsivante, antimicrobiana, antiviral, antituberculosa, antidiabética, anti-inflamatória, antiproliferativa, antioxidante, antiurease, antimalárica, fotoprotetora e anticancerígena (KUMAR et al., 2021; LIMA et al., 2019).

Além disso, diversos fármacos que possuem em sua estrutura o 1,2,3-triazol já estão disponíveis no mercado, como TSAO (anti-HIV), Cefatrizina (antibiótico), CAI (anticâncer) e Tazobactam (antibacteriano), comprovando a relevância clínica deste heterociclo. Essa versatilidade reforça o papel dos triazóis como ferramentas estratégicas na derivatização de moléculas bioativas, permitindo não apenas a otimização da eficácia terapêutica, mas também a melhoria de parâmetros farmacocinéticos e de segurança. (CHEN et al., 2021). Essas moléculas referentes a esses fármacos já comercializados estão presentes na figura 9 abaixo.

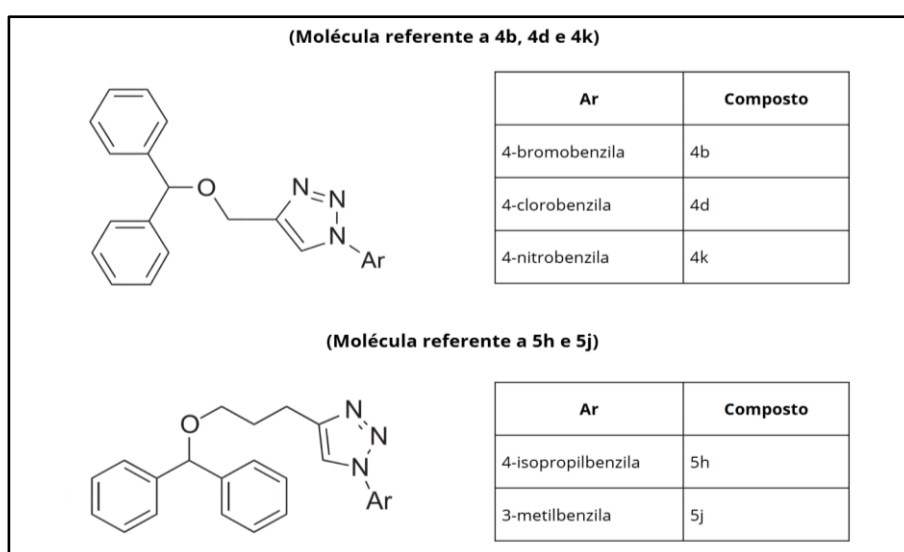
Figura 9 – Medicamentos em uso clínico contendo o anel 1,2,3-triazol



Fonte: Adaptado de Chen et al. (2021).

Nesse contexto, Lima et al. (2019) sintetizaram vinte e sete derivados triazólicos da benzofenona e avaliaram suas propriedades biológicas. O composto 4k destacou-se pela atividade fotoprotetora, enquanto os derivados 5j e 5h demonstraram atividade antiviral contra o vírus Zika. Adicionalmente, os compostos 4b, 4d e 5h exibiram efeito citotóxico frente a linhagens de câncer de mama humano. As moléculas dos derivados citados foram apresentadas abaixo na figura 10.

Figura 10 – Derivados triazólicos da benzofenona: 4b, 4d, 4k, 5h e 5j



Fonte: Adaptado de Lima et al. (2019)

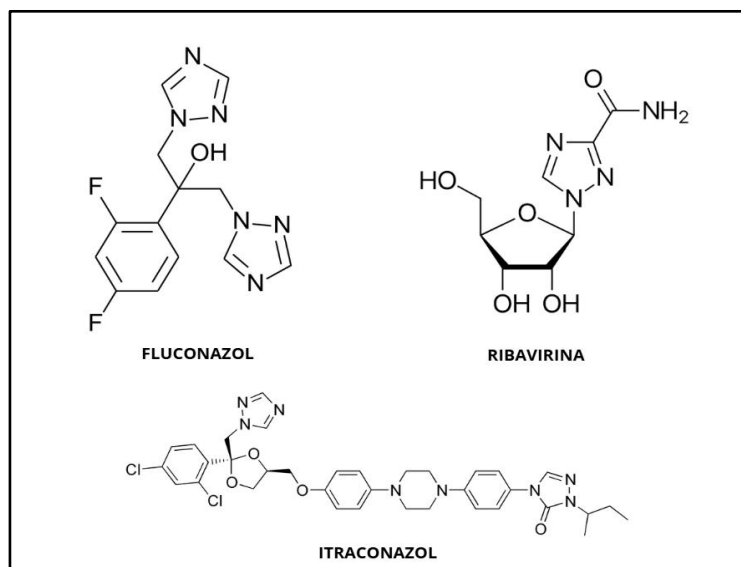
Os derivados triazólicos, especialmente aqueles do tipo 1,2,4-triazol, têm se mostrado extremamente versáteis na química medicinal. Diversas aplicações farmacológicas têm sido relatadas, incluindo atividades antifúngicas, antimicrobianas, anticancerígenas e citotóxicas. Tais propriedades destacam o 1,2,4-triazol como uma molécula heterocíclica promissora para a síntese de novos compostos bioativos (KUMAR et al., 2026).

Estudos recentes demonstram que modificações estruturais no núcleo triazólico podem gerar compostos com elevada seletividade e potência farmacológica. Por exemplo, determinados derivados apresentaram forte inibição de mediadores inflamatórios, como Fator de Necrose Tumoral (TNF), além de destacarem-se em ensaios de docking molecular com elevada afinidade por alvos enzimáticos, como a COX-2 (HAMOUD et al., 2022; GLOMB et al., 2024).

Outros compostos mostraram efeitos antivirais e antifúngicos relevantes, estando presentes inclusive em fármacos já consolidados na prática clínica, como o Fluconazol,

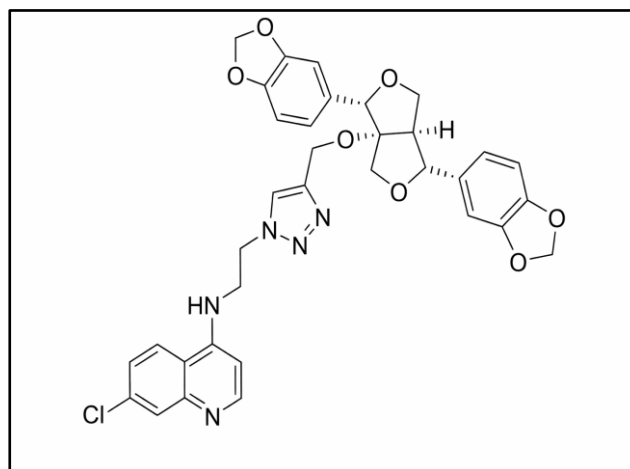
Ribavirina e Itraconazol, apresentados na figura 11. Essa diversidade de aplicações evidencia que o núcleo triazólico não apenas confere estabilidade química às moléculas, mas também amplia seu espectro terapêutico, tornando-se uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes contra doenças inflamatórias, infecciosas e neoplásicas (AJMAL et al., 2024).

Figura 11 – Estruturas moleculares do Fluconazol, Ribavirina e Itraconazol



Fonte: Adaptado de PubChem.

O estudo de Reis et al. (2025) descreveu a síntese e avaliação do derivado paulownina triazol-cloroquinolina (composto 7), apresentado na figura 12, através da inserção do 1,2,3-triazol e quinolina, reconhecidas por suas propriedades antivirais. O composto não demonstrou citotoxicidade em células Vero e exibiu atividade antiviral potente, com CE_{50} de 9,05 μ M e índice de seletividade (IS) superior a 16,8, indicando uma ampla janela terapêutica frente ao CHIKV. Além disso, o derivado 7 foi 46 vezes mais ativo que a amantadina, utilizada como controle positivo, e também mostrou atividade frente ao MAYV, embora menos expressiva (EC_{50} de 67,59 μ M; IS > 2,3). Ensaios de inibição do efeito citopático confirmaram a proteção da monocamada celular, e análises por RT-qPCR demonstraram redução significativa da replicação viral. Esses achados reforçam o potencial do derivado 7 como candidato seletivo e eficaz para o tratamento de infecções por CHIKV.

Figura 12 – Derivado paulownina triazol-cloroquinolina

Fonte: Adaptado de Reis et al. (2025)

Esses resultados reforçam que a introdução do núcleo triazólico pode conferir novas propriedades terapêuticas, consolidando sua importância como estratégia de derivatização de moléculas naturais, como o eugenol, e ampliando suas perspectivas de aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas.

3. JUSTIFICATIVA

As substâncias naturais representam uma fonte promissora, cujas propriedades medicinais vêm sendo investigadas em diferentes partes do mundo por grupos de pesquisa que buscam identificar novos compostos ativos capazes de servir como fármacos ou como modelos para o desenvolvimento de agentes antivirais.

O eugenol, principal constituinte do óleo essencial de cravo-da-índia, é um composto fenólico que já demonstrou diversas atividades farmacológicas, incluindo, atividade antiviral frente a diferentes vírus, como HSV e os arbovírus CHIKV, ZIKV e MAYV, além de servir como núcleo químico para a síntese de derivados com potencial ampliado. Estudos recentes também evidenciam que a incorporação de fragmentos triazólicos em moléculas fenólicas pode aumentar a seletividade e a potência farmacológica, resultando em compostos ativos contra os arbovírus.

Nesse cenário, a escolha dos arbovírus CHIKV, ZIKV, MAYV e OROV se justifica pela relevância epidemiológica dessas doenças no Brasil e pela ausência de antivirais específicos disponíveis para o tratamento. A investigação de derivados sintéticos do eugenol,

incluindo estruturas triazólicas, representa uma estratégia inovadora para identificar moléculas capazes de interferir em etapas críticas do ciclo viral, como adsorção, entrada e replicação.

Considerando a escassez de estudos publicados sobre os efeitos antivirais de moléculas naturais contra os vírus ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, este trabalho propôs a investigação de substâncias bioativas capazes de atuar nessas infecções, contribuindo para o avanço do conhecimento científico na área. A identificação de moléculas promissoras poderia gerar patentes e possibilitar o desenvolvimento de protótipos ou medicamentos direcionados ao tratamento dessas viroses.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antiviral *in vitro* de derivados sintéticos do eugenol frente aos arbovírus CHIKV, ZIKV, MAYV e OROV.

4.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a citotoxicidade dos derivados sintéticos do eugenol em células Vero;
- Determinar a atividade antiviral frente aos vírus CHIKV, ZIKV, MAYV e OROV;
- Confirmar a atividade antiviral por ensaios de inibição do efeito citopático da substância ativa;
- Investigar a possível ação virucida direta da substância mais ativa.

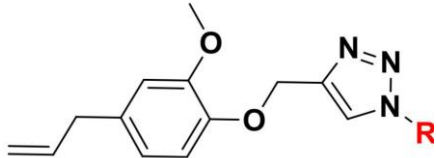
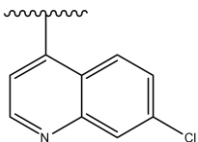
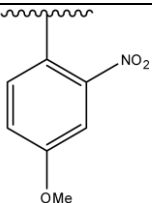
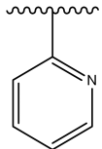
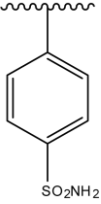
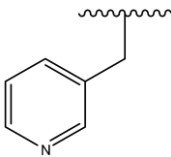
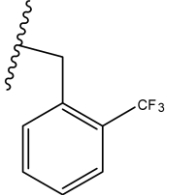
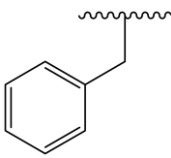
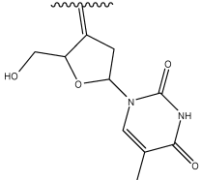
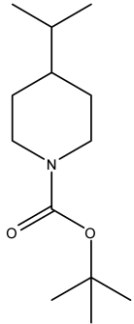
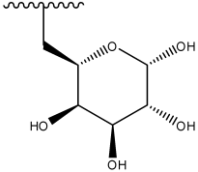
5.MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Síntese dos Derivados do Eugenol

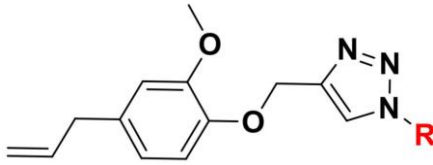
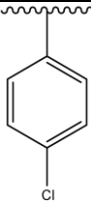
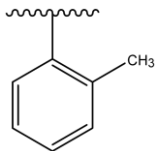
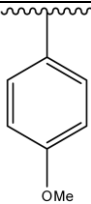
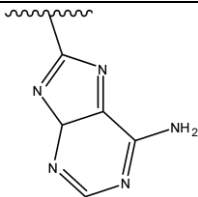
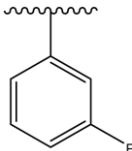
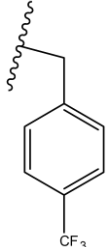
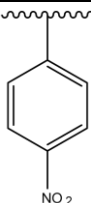
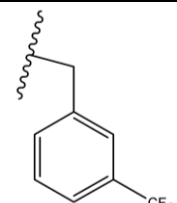
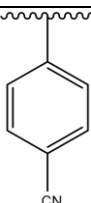
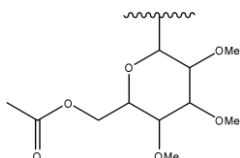
Foram empregadas substâncias presentes na coleção de compostos naturais e sintéticos do Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia – UFOP, cuja síntese foi realizada pelo grupo de pesquisa parceiro coordenado pelo do Prof. Dr. Guilherme Rocha Pereira da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). As substâncias foram selecionadas dentre

os grupos de derivados do eugenol, totalizando 21 moléculas, assim como mostrado no quadro 1.

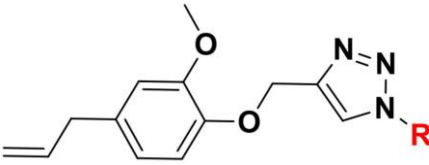
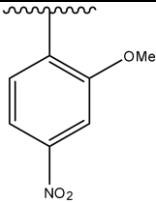
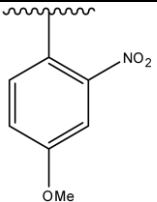
Quadro 1 – Estruturas moleculares das 21 substâncias sintetizadas e testadas.

			
SUBSTÂNCIA	R	SUBSTÂNCIA	R
E-2		E-15	
E-3		E-16	
E-4		E-17	
E-5		E-18	
E-6		E-19	

Quadro 1 – Estruturas moleculares das 21 substâncias sintetizadas e testadas.

			
SUBSTÂNCIA	R	SUBSTÂNCIA	R
E-8		E-21	
E-9		E-23	
E-11		E-24	
E-12		E-26	
E-13		E-27	

Quadro 1 – Estruturas moleculares das 21 substâncias sintetizadas e testadas.

			
SUBSTÂNCIA	R	SUBSTÂNCIA	R
E-14		E-15	

5.2 Ensaios Biológicos

Os experimentos biológicos foram conduzidos utilizando-se amostras virais específicas e suas linhagens celulares correspondentes:

CHIKV – A amostra de CHIKV (cepa S27-African) 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 UFP/mL.

MAYV - A alíquota foi multiplicada em célula Vero e titulada para determinação da UFP/mL (título viral). A alíquota de MAYV (cepa Acre27) foi cedida pela Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, da Universidade Federal de Medicina de São José do Rio Preto. A amostra de MAYV usada foi isolada de um humano no Estado do Acre (cepa Acre27).

ZIKV - A amostra de Zika vírus utilizado para a propagação *in vitro* deste vírus foi obtida de um paciente com quadro clínico sem complicações, residente no estado de Pernambuco (PE-243/215). Esta amostra foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Erna Geessien Kroon, da UFMG.

OROV - A amostra de OROV (cepa BeAn 19991) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, do Instituto de Pesquisa em Virologia da Universidade Federal de São Paulo.

Células Vero: As células Vero foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade, na produção do CHIKV, MAYV e OROV, nas determinações dos títulos virais e para avaliação da atividade antiviral. Estas células são derivadas de rins de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/ml) e anfotericina B (5 g/ml), em estufa com 5% de CO₂, a 37°C.

Células C6/36: As células C6/36 foram utilizadas na produção do vírus estoque de ZIKV. Essas, são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*, multiplicadas em meio L15 suplementado com 5% SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 U/mL) e anfotericina (5 g/mL), em ambiente a 37°C, em estufa BOD (sem demanda de oxigênio).

5.3 Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral

5.3.1 Ensaio de citotoxicidade através método colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5- difenil brometo de tetrazolina (MTT)

O reagente MTT é composto por um núcleo de anel tetrazólico quaternário carregado positivamente, contendo quatro átomos de nitrogênio, circundado por três anéis aromáticos, incluindo dois grupos fenil e um anel tiazolil (GHASEMI et al., 2021). Esse ensaio consiste na clivagem do MTT por meio de células viáveis da mitocôndria, com o auxílio enzimático da succinato desidrogenase. O sal de tetrazólio é hidrossolúvel e possui coloração amarela, já a formazana, seu produto de degradação, é um precipitado insolúvel em meio aquoso e possui coloração azul-violeta (MOSMANN, 1983; TWENTYMAN e LUSCOMBE, 1987).

O presente trabalho buscou determinar a citotoxicidade das moléculas em diferentes concentrações, com a finalidade de estabelecer limites seguros de uso celular. Tal análise foi indispensável para assegurar que os experimentos antivirais fossem conduzidos em condições adequadas, empregando concentrações inferiores ao CC₅₀, seguindo protocolo adaptado de Brandão et al. (2010).

As células foram distribuídas em microplacas de microtitulação de 96 poços com fundo chato contendo $2,0 \times 10^4$ células/cavidade. As culturas foram incubadas em atmosfera úmida, a 5% de CO₂, a 37 °C. Foram preparadas diluições das amostras testes em DMEM 1% SFB (Soro Fetal Bovino), em concentrações que variaram entre 200 e 1,5625 µg/mL. Após 24 horas, a monocamada celular na superfície dos poços foi formada, o meio de cultura removido e 100µL

das soluções diluídas dos compostos e 100 µL de meio de cultura DMEM 1% SFB foram adicionados. Após 48 horas do tratamento, 25 µL do MTT foi adicionado 120 minutos antes das leituras (MOSMANN, 1983), após esse período, houve a adição de 80 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazana, e então a leitura foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas, 72 horas após a adição das substâncias teste/extrato.

A toxicidade celular foi expressa pela concentração citotóxica capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células (CC_{50}). O cálculo da porcentagem de citotoxicidade foi realizado pela fórmula $[(A-B)/A] \times 100$, em que A corresponde à densidade óptica a 492 nm (DO_{492}) das células não tratadas e B à das células expostas às substâncias.

5.3.2 Avaliação da atividade antiviral *in vitro* pela técnica colorimétrica do MTT frente aos arbovírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV

5.3.2.1 Preparo das suspensões estoques virais

Descrito por Reed e Muench et al. (1938) para o preparo dos estoques de vírus, utilizou-se células C6/36 ou Vero, cultivadas em garrafas de 150 cm³ e infectadas com 0,01 UFP. Após a visualização do efeito citopático e/ou morte celular em 90 a 100% das células, foram centrifugadas por 5 min, a 4°C. Foi aliquoteado o sobrenadante, congelado a -70°C e, logo após, titulado.

5.3.2.2 Determinação dos títulos infecciosos virais por $TCID_{50}$

O título viral corresponde ao número de unidades infecciosas presentes por unidade de volume, sendo cada unidade infecciosa definida como a menor quantidade de vírus capaz de infectar uma célula. A partir desse conceito, a dose infecciosa mediana em cultura de tecidos ($TCID_{50}$) é estabelecida como a diluição viral necessária para provocar infecção em 50% das células de uma determinada cultura (LEI et al., 2020). Esse cálculo permite estimar a quantidade de unidades infecciosas presentes na suspensão original de vírus, a partir da observação do efeito citopático (ECP) em metade das células expostas.

Para o ensaio, células Vero foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,0 \times 10^4$ células/cavidade) com fundo chato até a formação da monocamada. Em seguida, foram infectadas com suspensões virais de ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV. Foram preparadas dez diluições seriadas dos vírus em meio DMEM suplementado com 1% de SFB.

Após o descarte do meio de cultura, adicionaram-se 100 µL de cada diluição em oito réplicas por concentração, seguidos de 100 µL de meio fresco. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C, e o desenvolvimento do ECP foi monitorado diariamente por cinco dias.

Esse procedimento é fundamental para padronizar a carga viral utilizada nos ensaios subsequentes, garantindo reprodutibilidade e permitindo comparar a eficácia das substâncias testadas em condições equivalentes.

5.3.2.3 Avaliação da atividade antiviral pela técnica colorimétrica utilizando MTT

Utilizou-se para esses experimentos a técnica descrita por Brandão et al. (2010). Soluções de estoque das amostras foram preparadas, em DMSO, as quais foram avaliadas em concentrações não citotóxicas.

As monocamadas celulares foram cultivadas em placas microtitulação de 96 cavidades (2,0 x 10⁴ células/cavidade) com fundo chato. Após 24 horas de incubação em 5% de CO₂, a 37°C, o meio de cultura (DMEM 5% SFB) foi removido e 100 µL das diluições das amostras foram adicionados em cada cavidade, juntamente com 100 µL da suspensão viral. Depois, as culturas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37°C, por 72 horas. Realizou-se 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). Ademais, apesar de não haver antivirais específicos para os arbovírus, os testes foram comparados com um controle positivo para cada vírus, a ribavirina para o ZIKV (KAMIYAMA et al., 2017) e MAYV (FERREIRA et al., 2018), a amantadina para o CHIKV (DEY et al., 2019) e a cloroquina para o OROV (ACRANI et al., 2010), simultaneamente, em circunstâncias idênticas como relatado anteriormente (BETANCUR-GALVIS et al., 2002). A viabilidade celular foi avaliada pela técnica colorimétrica do MTT (MOSMANN, 1983). O sobrenadante foi removido e, em seguida, adicionou-se 25,0 µL de uma solução de MTT (1,0 mg/ml em PBS), em cada cavidade. Houve o incubamento das placas durante 120 minutos a 37 °C e, após este tempo, para dissolver os cristais de formazana, 80,0 µL de DMSO foram inseridos em cada cavidade. As placas foram homogeneizadas em agitador de placas durante 15 minutos, e a densidade óptica foi determinada em leitor de microplacas, a 492 nm (DO₄₉₂) (REIS et al., 2020, REIS et al., 2022)

A eficácia antiviral foi expressa pela concentração efetiva capaz de proteger 50% das células contra os danos induzidos pela infecção viral (CE₅₀). Esse parâmetro corresponde à concentração necessária para reduzir em 50% o efeito citopático causado pelo vírus. A

porcentagem de proteção celular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Proteção (\%)} = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100$$

Nas análises, as cavidades foram organizadas em três grupos: células tratadas e infectadas (A), células infectadas sem tratamento (B) e células não tratadas nem infectadas (C).

Esse método é amplamente utilizado em estudos antivirais por sua confiabilidade e simplicidade, permitindo avaliar simultaneamente a viabilidade celular e a eficácia das substâncias testadas. Além disso, o uso de controles positivos e negativos garante maior robustez na interpretação dos resultados, possibilitando comparar o desempenho das moléculas investigadas com antivirais já estabelecidos.

Para garantir a confiabilidade e a adequada interpretação dos resultados obtidos, diferentes grupos-controle foram incluídos durante a realização dos ensaios. O controle celular foi constituído por monocamadas mantidas apenas em meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB), sem exposição ao vírus ou aos compostos avaliados, permitindo estabelecer o padrão de viabilidade celular. Para a avaliação da citotoxicidade das amostras, as células foram incubadas com as mesmas concentrações dos compostos empregadas nos ensaios antivirais, porém na ausência da infecção viral, possibilitando verificar se eventuais alterações observadas eram decorrentes da ação citotóxica das substâncias.

O controle viral consistiu em monocamadas infectadas com as suspensões virais, mantidas sem qualquer tratamento, sendo utilizado como referência para a observação do efeito citopático induzido pelo vírus. Adicionalmente, foi realizado um controle contendo apenas o veículo de solubilização das amostras (DMSO), no qual células infectadas receberam exclusivamente o solvente, permitindo confirmar que este não exercia influência sobre a atividade antiviral observada.

Como controle positivo, empregaram-se fármacos com atividade antiviral previamente descrita na literatura. A ribavirina foi utilizada como referência para os ensaios com ZIKV (KAMIYAMA et al., 2017) e MAYV (FERREIRA et al., 2018), enquanto a amantadina foi empregada nos experimentos com CHIKV (DEY et al., 2019) e a cloroquina para o OROV (ACRANI et al., 2010). As soluções dos controles positivos foram preparadas em DMSO e posteriormente diluídas em meio DMEM contendo antibióticos e 1% de SFB, sendo utilizadas como parâmetro de comparação para validar a atividade antiviral das substâncias investigadas.

5.3.2.4 Análise estatística

Foi utilizado o Teste t de Student, nas análises de variância para avaliar diferenças entre as médias nos ensaios de citotoxicidade, antiviral e virucida em comparação com os controles. Foram aceitos para todos os testes o nível de significância de 5%. Utilizou-se o pacote estatístico do GraphPad Prism 5.04.

5.3.2.5 Determinação do índice de seletividade para os compostos avaliados e a potência relativa

O cálculo do índice de seletividade (IS) é realizado 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). Em termos ideais, um fármaco deve apresentar uma concentração tóxica elevada, garantindo segurança, ao mesmo tempo em que exibe uma concentração ativa reduzida, assegurando eficácia mesmo em doses mínimas (INDRAYANTO et al., 2021).

Dessa forma, para o caso das substâncias que apresentaram certa inibição para pelo menos uma das arboviroses utilizadas nesse estudo, o IS é calculado, como descrito na equação.

$$IS = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

Ademais, foi realizado o cálculo da potência relativa (PR), a qual compara o CE_{50} do padrão de referência e o CE_{50} das substâncias ativas (REIS et al., 2025)

$$PR = \frac{CE_{50} \text{ (padrão de referência)}}{CE_{50} \text{ (substância ativa)}}$$

5.3.2.6 Critérios para avaliação da atividade citotóxica e antiviral

Na interpretação dos ensaios antivirais *in vitro* contra os arbovírus, foram considerados parâmetros de seletividade descritos na literatura. Em relação à citotoxicidade dessas substâncias, um dos parâmetros avaliados foi a observação microscópica das alterações morfológicas celulares.

A ação citotóxica manifesta-se pela perda da organização da monocamada celular,

acompanhada pelo surgimento de células com formato arredondado e textura granulosa. Essas alterações estruturais refletem modificações morfológicas típicas desencadeadas quando os cultivos celulares entram em contato com agentes externos. As modificações morfológicas observadas foram comparadas com os grupos controle, permitindo avaliar o impacto dos tratamentos. Esse procedimento possibilita determinar a concentração responsável por reduzir a viabilidade de aproximadamente 50% das células (CC_{50}) (FRÖHNER, 2003).

5.3.2.7 Ensaio antiviral por inibição do efeito citopático

Esse experimento foi realizado em placas para cultivo de células de 6 poços ($1,0 \times 10^6$ células/poço) com fundo chato e utilizou-se como tratamento valores próximo da concentração efetiva a 50% do composto ativo **E-11** e a infecção viral foi realizada com multiplicidade de infecção (MOI) igual a 1,0. Como controles, foi ensaiada uma monocamada de células não infectadas e não tratadas (controle de células), não tratada e infectada (controle de vírus) e uma monocamada não infectada e tratada (controle de citotoxicidade do composto). As células tratadas e infectadas foram fotografadas, utilizando o aplicativo ZEN 2.3 lite, com o auxílio do microscópio invertido (Zeiss®), e as imagens foram capturadas 48h após infecção (REIS et al., 2020, REIS et al., 2022). Além disso, o sobrenadante dos poços de controle de vírus e dos poços tratados e infectados foram coletados para posterior titulação por meio do ensaio de placas de lise descrito por Dulbecco (1952). Esse ensaio teve como objetivo confirmar os resultados observados nas substâncias ativas do ensaio antiviral *in vitro* realizado.

5.3.2.8 Ensaio virucida

A atividade virucida baseia-se na capacidade da amostra testada de destruir ou inativar diretamente a partícula viral (SILVA et al., 2018). Esse experimento foi realizado, em duplicata, em placas de 6 poços ($1,0 \times 10^6$ células/poço) com fundo chato, e a substância ativa **E-11** foi utilizada no tratamento dos vírus ZIKV, MAYV e CHIKV. Este pré tratamento foi realizado em microtubos de 1,5mL e a substância foi incubada com o vírus (MOI = 10), bem como o controle de vírus (apenas suspensão viral sem tratamento), que foram armazenados em estufa a 5% de CO_2 , a $37^\circ C$, durante um período de 1 hora. Após esse tempo, o sobrenadante das placas de 06 poços com monocamada celular Vero, que foram previamente preparadas, foi removido e o vírus tratado (vírus + composto) e a suspensão viral (controle de vírus) adicionados para ser

realizada a adsorção viral nas células. As placas retornaram à estufa e durante um período de 1 hora, foi necessário homogeneizar em movimentos cruzados de 10 em 10 minutos. Subsequente a esse período, o sobrenadante foi removido e o meio semissólido (meio DMEM-HG + 1,5% CMC) é adicionado. Após 72 horas foi realizada a fixação da monocamada celular com formol a 10% e, em seguida, a mesma foi corada com cristal violeta (solução de 1% de cristal violeta em etanol a 20%). Foram contadas as unidades formadoras de placas (UFP) e o título viral determinado por UFP/mL, conforme descrito por Dulbecco (1952).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral *in vitro*

A determinação da citotoxicidade na linhagem celular Vero e as atividades anti-arbovírus *in vitro* frente ao CHIKV, MAYV, ZIKV e OROV foi realizada pelo método colorimétrico do MTT e estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade (CC₅₀) nas células Vero e determinação da atividade da antiviral (CE₅₀) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, em linhagem celular Vero, com respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), das substâncias de síntese

SUBSTÂNCIA	VERO CC ₅₀ µM	ZIKV ^a CE ₅₀ µM	IS ^b	CHIKV ^c CE ₅₀ µM	IS	MAYV ^d CE ₅₀ µM	IS	OROV ^e CE ₅₀ µM	IS
E-2	> 475.17	NA	–	NA	–	449.04 ± 3.13	1.06	NA	–
E-3	132.26 ± 5.26	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-4	524.75 ± 4.80	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-5	> 547.23	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-6	> 399.45	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-8	> 540.76	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade (CC₅₀) nas células Vero e determinação da atividade da antiviral (CE₅₀) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, em linhagem celular Vero, com respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), das substâncias de síntese

SUBSTÂNCIA	VERO CC ₅₀ µM	ZIKV ^a CE ₅₀ µM	IS ^b	CHIKV ^c CE ₅₀ µM	IS	MAYV ^d CE ₅₀ µM	IS	OROV ^e CE ₅₀ µM	IS
E-9	> 547.30	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-11	> 565.94	38.23 ± 5.55	> 14.80	88.46 ± 4.24	> 6.40	75.86 ± 5.15	> 7.46	68.34 ± 4.47	> 8.28
E-12	> 524.37	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-13	> 554.92	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-14	> 486.10	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-15	> 486.10	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-16	> 482.53	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade (CC₅₀) nas células Vero e determinação da atividade da antiviral (CE₅₀) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, em linhagem celular Vero, com respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), das substâncias de síntese

SUBSTÂNCIA	VERO CC ₅₀ µM	ZIKV ^a CE ₅₀ µM	IS ^b	CHIKV ^c CE ₅₀ µM	IS	MAYV ^d CE ₅₀ µM	IS	OROV ^e CE ₅₀ µM	IS
E-17	> 482.53	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-18	> 399.23	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-19	> 374.77	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-21	441.82 ± 3.81	148.36 ± 5.03	2.98	NA	–	171.19 ± 7.09	2.58	71.34 ± 4.75	6.19
E-23	> 411.04	212.51 ± 5.14	> 1.93	NA	–	129.23 ± 2.45	> 3.18	NA	–
E-24	> 479.12	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
E-26	319.10 ± 3.71	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–

Tabela 1 – Avaliação da citotoxicidade (CC_{50}) nas células Vero e determinação da atividade da antiviral (CE_{50}) frente aos vírus: ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV, em linhagem celular Vero, com respectivos desvios padrões ($n=3$) e índice de seletividade (IS), das substâncias de síntese

SUBSTÂNCIA	VERO $CC_{50} \mu M$	ZIKV ^a $CE_{50} \mu M$	IS ^b	CHIKV ^c $CE_{50} \mu M$	IS	MAYV ^d $CE_{50} \mu M$	IS	OROV ^e $CE_{50} \mu M$	IS
E-27	> 395.60	NA	–	NA	–	NA	–	NA	–
Ribavirina (Controle positivo)	1516.75 ± 1.20	433.24 ± 1.60	3.50	NT	–	431.24 ± 2.21	3.52	NT	–
Amantadina (Controle positivo)	561.26 ± 1.16	NT	–	418.98 ± 1.70	1.34	NT	–	NT	–
Cloroquina (Controle positivo)	131.12 ± 1.29	NT	–	NT	–	NT	–	83.41 ± 2.34	1.6

Nota: ^aZIKV: Título viral 1×10^3 TCID₅₀/mL; ^bIS (Índice de seletividade) = $CC_{50(Vero)}/EC_{50(Vero)}$; ^cCHIKV: Título viral 1×10^4 TCID₅₀/mL; ^dMAYV: Título viral 1×10^4 TCID₅₀/mL; ^eOROV: Título viral 1×10^3 TCID₅₀/mL ; NA: Não ativo; –: Não determinado; NT: Não testado

A citotoxicidade *in vitro*, medida pela concentração citotóxica a 50% (CC₅₀), foi analisada na linhagem celular Vero, 72 horas após a exposição aos derivados do eugenol. O valor de CC₅₀ representa a concentração que causa 50% de morte celular (NAUMENKO et al., 2023). Além disso, essa avaliação da citotoxicidade é essencial para garantir que, nos ensaios antivirais *in vitro* subsequentes, sejam utilizadas concentrações não tóxicas, ou seja, concentrações abaixo da CC₅₀. Como observado na tabela 2, os derivados do eugenol apresentaram CC₅₀ variando entre 565.94 µM e concentrações de 132.26 ± 5.26 µM, sendo as substâncias E-2, E-5, E-6, E-8, E-9, E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-23, E-24 e E-27 não tóxicas na maior concentração testada por cada uma delas e as substâncias que o CC₅₀ foi inferior à concentração máxima testadas foram E-3 (132.26 ± 5.26 µM), E-4 (524.75 ± 4.80 µM), E-21 (441.82 ± 3.81 µM) e E-26 (319.10 ± 3.71 µM).

A análise de citotoxicidade evidenciou que a maioria dos derivados de eugenol não comprometeu a viabilidade da linhagem celular Vero, mesmo na maior concentração testada. Apenas alguns compostos apresentaram valores de CC₅₀ inferiores ao limite máximo avaliado, situando-se entre 132.26 ± 5.26 µM e 524.75 ± 4.80 µM. Esses achados confirmam que os derivados investigados possuem um perfil de segurança favorável, permitindo a condução de ensaios antivirais subsequentes em concentrações abaixo da CC₅₀, sem risco de interferência por efeitos tóxicos.

Foi também determinada a concentração efetiva média (CE₅₀), a qual indica a concentração capaz de inibir em 50% o efeito citopático do vírus (CUETO et al., 2011). Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS), que é determinado pela razão entre a concentração citotóxica média e a concentração efetiva média. Esse valor indica a janela terapêutica da substância analisada (REIS et al., 2025). As substâncias **E-11** e **E-21** demonstraram ser substâncias ativas. A **E-11** apresentou atividade frente aos quatro arbovírus ZIKV, OROV, MAYV e CHIKV. Em relação ao ZIKV, exibiu CE₅₀ de $38,23 \pm 5,55$ µM e IS maior que 14,80. Contra o OROV, apresentou CE₅₀ de $68,34 \pm 4,47$ e IS maior que 8,28; frente ao MAYV, CC₅₀ de $75,86 \pm 5,15$ µM e IS maior 7,46; e em relação ao CHIKV, CC₅₀ de $88,46 \pm 4,24$ µM e IS maior que 6,40, indicando seletividade antiviral significativa. Já a substância **21** apresentou atividade frente ao OROV, com CE₅₀ de $71,34 \pm 4,75$ e IS de 6,19, frente ao ZIKV, com CE₅₀ de $148,36 \pm 5,03$ e IS de 2,98 e frente ao MAYV, CE₅₀ de $171,19 \pm 7,09$ e IS de 2,58.

Em relação a potência relativa, à ribavirina, utilizada como controle positivo nos ensaios com ZIKV e MAYV, a substância **E-11** apresentou PR aproximadamente quatro vezes superior

frente ao ZIKV e duas vezes maior contra o MAYV, evidenciando maior efeito antiviral em comparação às substâncias de referência. Em comparação à amantadina, utilizada como controle positivo para o CHIKV, a PR da substância **E-11** foi quase cinco vezes superior e em comparação à cloroquina, controle positivo para o OROV, foi mais de cinco vezes maior.

Em relação às características estruturais das substâncias ativas **E-11** e **E-21**, observa-se que ambas apresentam fatores que as diferenciam dos demais derivados avaliados. Do ponto de vista estrutural, o radical presente no derivado **E-11** consiste em um anel aromático substituído por flúor, correspondente ao grupo 3-fluorofenil. O átomo de flúor apresenta propriedades importantes para aplicações em química medicinal, como reduzido raio covalente (1,47 Å), elevada eletronegatividade (3,98 na escala de Pauling) e elevada energia de ligação C–F (≈ 472 kJ/mol) (CHANDRA et al., 2023). Dessa forma, a presença desse substituinte pode ter contribuído para o perfil antiviral mais amplo observado para **E-11**.

Já a substância **E-21**, embora tenha apresentado menor potência quando comparada à substância **E-11**, também demonstrou atividade antiviral frente ao OROV, indicando um diferencial estrutural em relação às demais moléculas da série. Esse derivado apresenta um grupo metila em posição orto no anel aromático. A lipofilicidade é um parâmetro relacionado à absorção, distribuição, biotransformação e eliminação dos compostos. Além disso, a afinidade da molécula por ambientes lipídicos pode impactar sua capacidade de atravessar membranas biológicas, bem como sua interação com proteínas plasmáticas e macromoléculas-alvo, fatores que podem influenciar diretamente sua atividade biológica e perfil toxicológico (MORAK-MŁODAWSKA et al., 2023).

A posição orto desse substituinte também pode influenciar na orientação espacial do anel aromático e a distribuição eletrônica local da molécula, contribuindo para interações específicas. Em contraste, os derivados inativos continham substituintes mais polares e/ou volumosos, como nitro, ciano e metoxi, os quais podem alterar significativamente as propriedades eletrônicas e estéricas da molécula. Assim, a atividade observada para a substância 21 sugere que a presença de um substituinte hidrofóbico pequeno em posição orto pode representar uma característica estrutural favorável para a atividade antiviral observada.

A comparação dos resultados obtidos nesse estudo com dados da literatura evidencia que diferentes radicais podem influenciar significativamente o perfil antiviral. Nos ensaios realizados por Péret (2025), os derivados mais ativos foram obtidos a partir do di-hidroeugenol, sugerindo que o grupo propil pode conferir maior atividade antiviral em relação ao grupo alil presente nos derivados do eugenol. O composto 16, por exemplo, apresentou atividade frente

ao ZIKV, CHIKV e MAYV, embora não tenha demonstrado efeito pré-infecção, comportamento semelhante ao observado no presente estudo nos ensaios virucidas. De forma análoga, o estudo de REIS (2025) com derivados triazólicos da paulownina mostrou que o composto 7 foi ativo contra ZIKV, CHIKV e MAYV, mas inativo frente ao OROV, também sem afetar diretamente o vírus. Esses achados reforçam que diferentes substituintes, como o grupo propil ou triazólicos específicos, podem representar alternativas promissoras para ampliar o espectro antiviral, corroborando a relevância das características estruturais observadas para as substâncias **E-11** e **E-21**.

6.2 Ensaio antiviral por inibição do efeito citopático

Para o ensaio antiviral por inibição do efeito citopático, realizado com a finalidade de confirmar a atividade antiviral observada pelo método colorimétrico do MTT, foi selecionado o derivado do eugenol **11**, ativo frente ao ZIKV, MAYV e CHIKV, em concentrações próximas da concentração efetiva média (ZIKV - 56,7 μ M; MAYV - 85,0 μ M; CHIKV - 99,1 μ M), nas figuras 13, 14 e 15 a seguir estão dispostas as imagens fotográficas da monocamada celular ensaiadas após 48 horas de tratamento. Embora ainda não tenham sido conduzidos ensaios frente ao OROV, estudos futuros estão planejados para avaliar a atividade da substância também contra esse arbovírus.

O ensaio antiviral por inibição do efeito citopático confirmou através de uma análise qualitativa que as substâncias promovem uma proteção da monocamada celular inibindo a multiplicação do vírus. O item A permitiu a visualização do controle viral, que exibiu a destruição da camada de células (morte celular) e de alterações morfológicas no tecido, como a presença de grumos, refringência e arredondamento celular, principalmente ao comparar com o controle celular, ou seja, células não tratadas e não infectadas (item B) que apresentam uma monocamada celular íntegra.

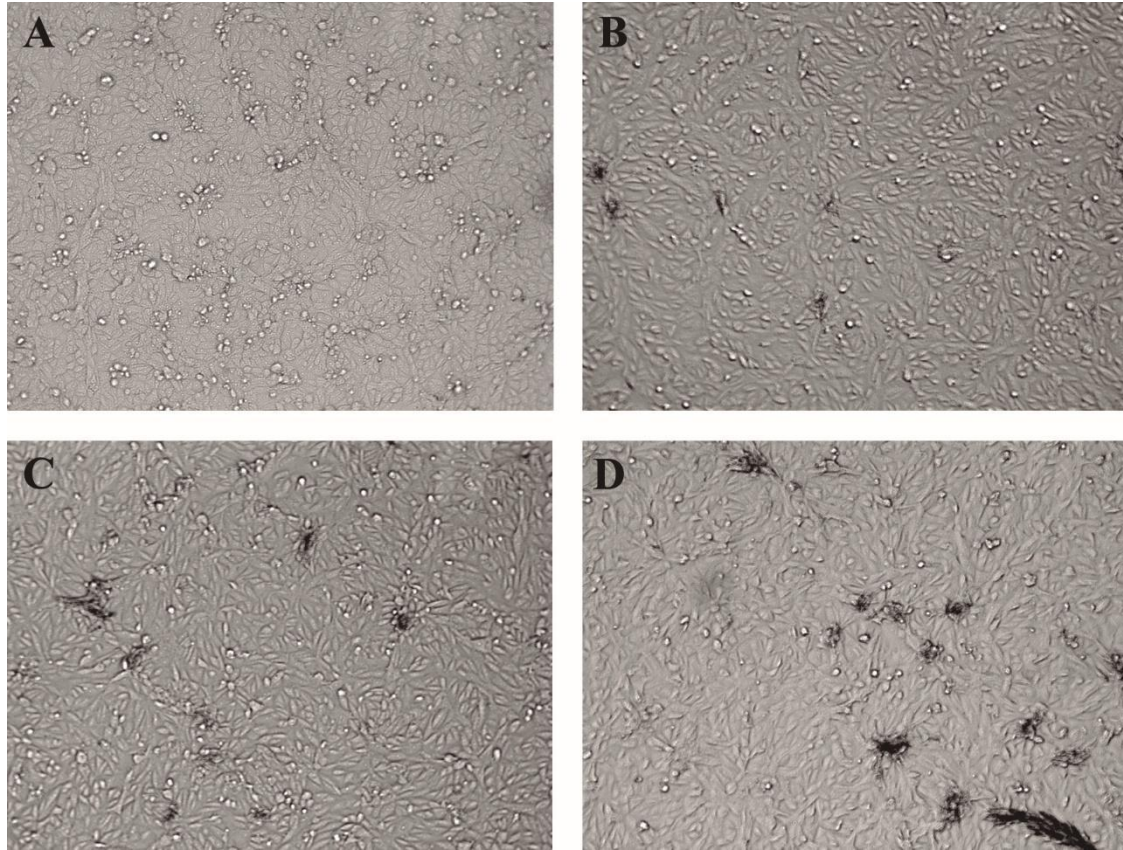
Nas células apenas tratadas com a substância **E-11** (item D), sem serem infectadas, utilizadas como controle de citotoxicidade, observa-se manutenção da viabilidade celular o que significa que as concentrações utilizadas não apresentam efeitos tóxicos para a monocamada celular, apresentando semelhança às células não tratadas e não infectadas (item B).

No poço de atividade antiviral, em que as células foram infectadas e tratadas com a CE₅₀ de **E-11** (item C), observa-se que o derivado **E-11** protege as células da infecção pelo vírus, uma vez que a monocamada celular permanece viável (aderida) sem alterações morfológicas,

indicando que as substâncias são eficazes em inibir o ciclo de multiplicação do ZIKV, MAYV e CHIKV, reafirmando a atividade anti-ZIKV, anti-MAYV e anti-CHIKV do derivado do eugenol.

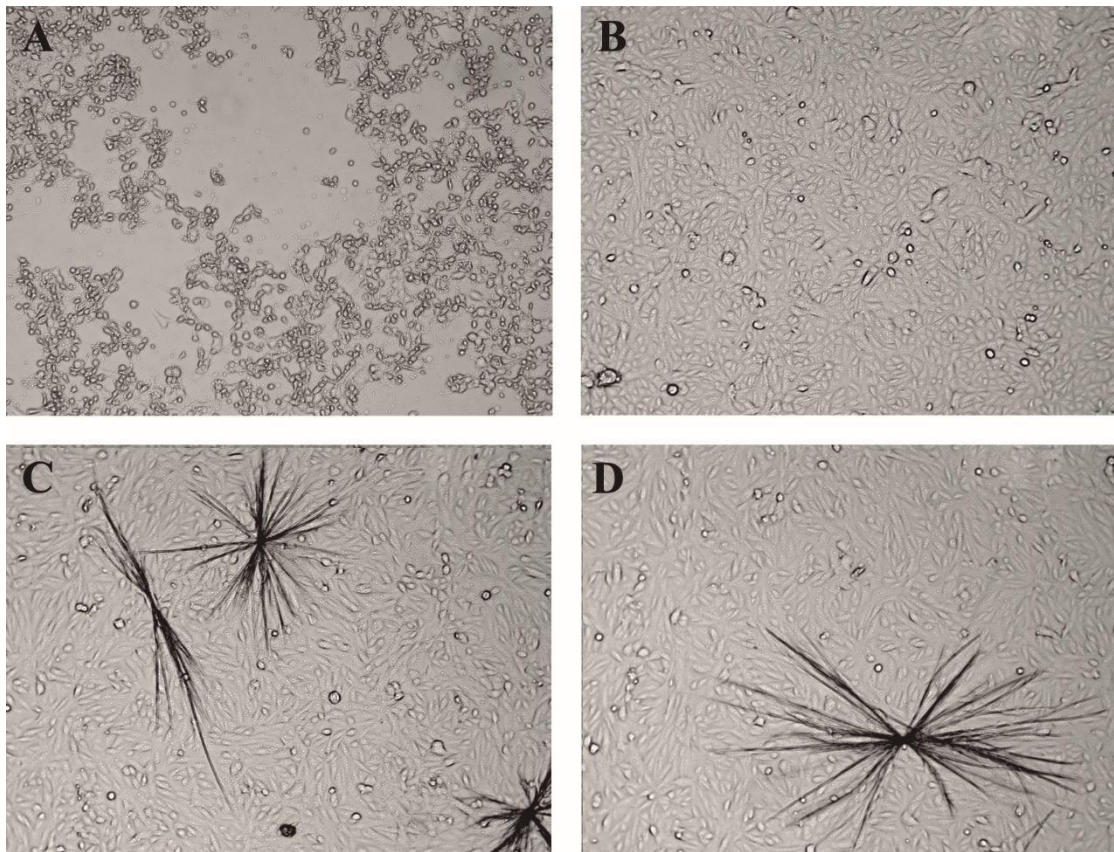
Além da análise qualitativa, foi realizada a coleta do sobrenadante do controle viral e do tratado, poço a qual recebeu o tratamento com o derivado **E-11**, para posterior quantificação pelo método de placas de lise, conforme apresentado na tabela 2 e gráfico 1. Na Tabela 2, estão apresentados os resultados da quantificação viral após a avaliação do efeito citopático da **E-11** frente aos vírus ZIKV, CHIKV e MAYV. No ensaio de 48 horas com o ZIKV, observou-se uma redução de 4,38 unidades logarítmicas nas células tratadas em comparação ao controle viral, evidenciando uma diminuição significativa da replicação. Em relação ao CHIKV, a substância promoveu uma diminuição de 4,17 unidades logarítmicas, enquanto no ensaio com o MAYV verificou-se a maior redução entre os vírus testados, correspondente a 5,16 unidades logarítmicas. Esses resultados confirmam o potencial antiviral da **E-11**, destacando sua ação mais expressiva contra o MAYV.

Figura 13 – Atividade antiviral por inibição do efeito citopático do ZIKV, em células Vero, tratadas com a substância E-11 (56,7 μ M), 48 horas após infecção.



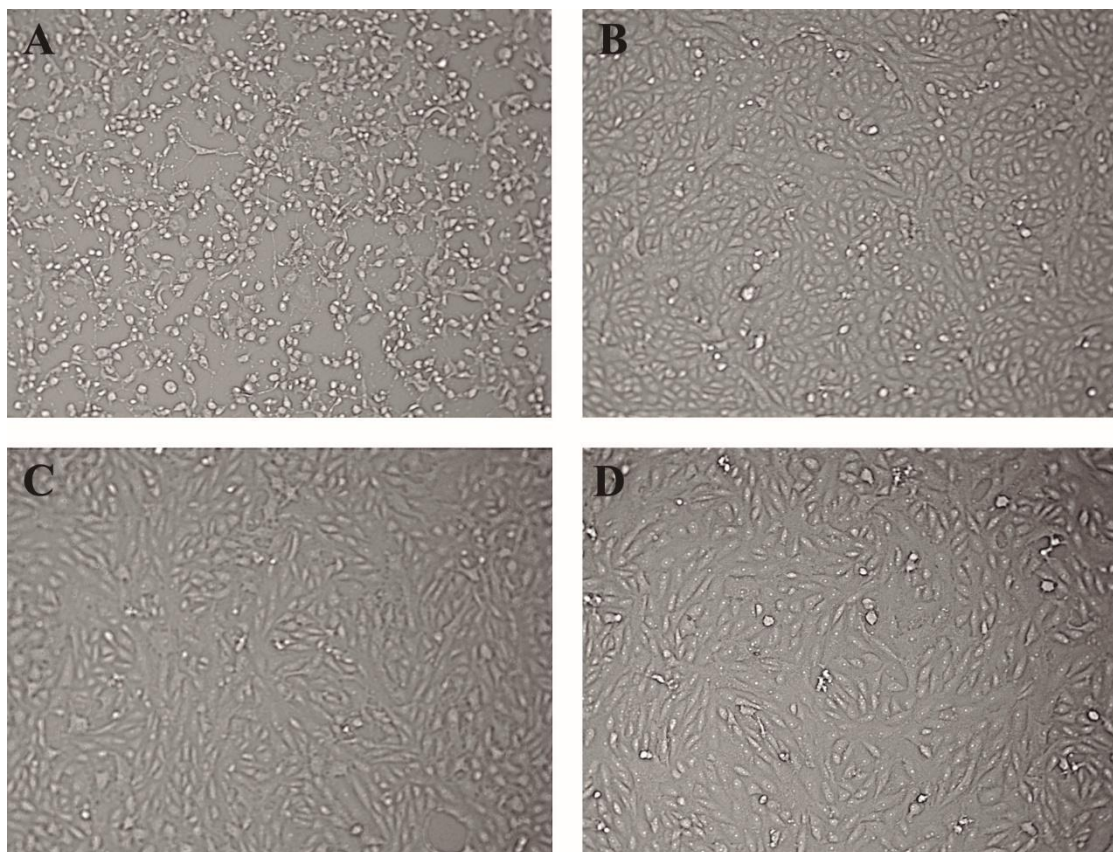
A: controle de vírus, B: controle de células, C: atividade antiviral do composto 11, D: controle de citotoxicidade do composto 11.

Figura 14 – Atividade antiviral por inibição do efeito citopático do MAYV, em células Vero, tratadas com a substância E-11 (85,0 μ M).



A: controle de vírus, B: controle de células, C: atividade antiviral do composto 11, D: controle de citotoxicidade da substância E-11.

Figura 15 – Atividade antiviral por inibição do efeito citopático do CHIKV, em células Vero, tratadas com a substância E-11 (99,11 μ M).

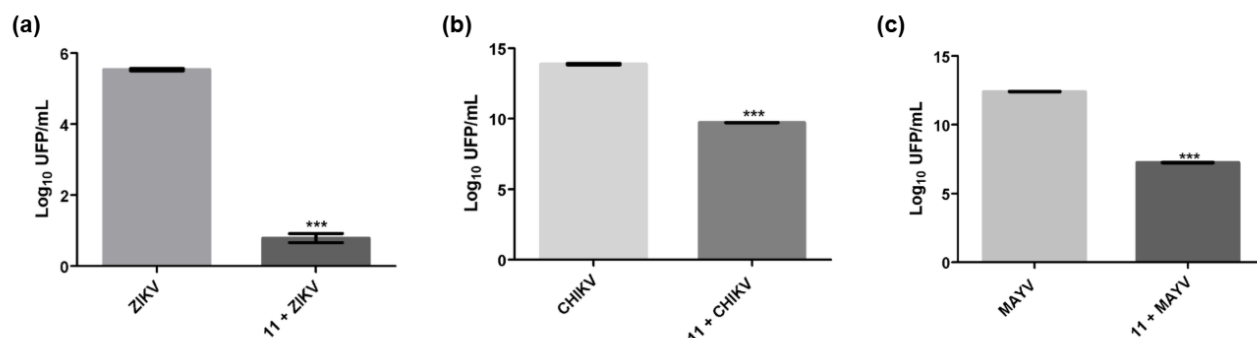


A: controle de vírus, B: controle de células, C: atividade antiviral do composto 11, D: controle de citotoxicidade da substância E-11.

Tabela 2 – Quantificação dos vírus após a avaliação do efeito citopático da substância E-11 contra ZIKV, CHIKV e MAYV.

Ensaio da avaliação do efeito citopático	Média da titulação (UFP/mL)	Log₁₀ UFP/mL
ZIKV – controle de vírus	3.495×10^3	5.54
11 + ZIKV	6.25	0.79
CHIKV – controle de vírus	7.66×10^{13}	13.88
11 + CHIKV	5.165×10^9	9.715
MAYV – controle de vírus	2.65×10^{12}	12.42
11 + MAYV	1.83×10^7	7.265

Gráfico 1 – Quantificação dos vírus (Log UFP/mL) ZIKV, CHIKV e MAYV, 48 horas após a infecção, no ensaio de inibição do efeito citopático da substância **E-11** (UFP/mL)



CHIKV: controle de vírus, 11 + CHIKV: células tratadas com a substância 11 (99,11µM) e infectadas com CHIKV, ***: $p < 0.0001$; MAYV: controle de vírus, 11 + MAYV: células tratadas com a substância 11 (85,0µM) e infectadas com MAYV, *** : $p < 0.0001$; ZIKV: controle de vírus, 11 + ZIKV: células tratadas com a substância 11 (56,7µM) e infectadas com ZIKV, ***: $p < 0.0004$.

6.3 Ensaio Virucida

O ensaio virucida foi realizado para o composto frente aos vírus ZIKV, MAYV e CHIKV. Esse teste é fundamental, pois avalia a capacidade da molécula em interagir diretamente com partículas virais, promovendo sua desestabilização física. De forma mais ampla, também abrange a habilidade de se ligar às partículas virais e neutralizar sua infectividade, mesmo sem alterações morfológicas aparentes (AOKI-UTSUBO et al., 2018).

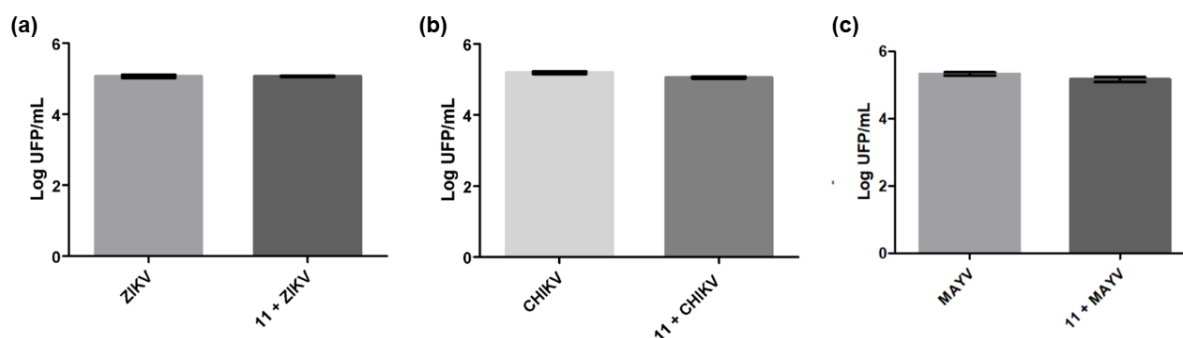
A substância **E-11** derivada do eugenol (56,7µM) ativo frente ao ZIKV e, também, ativo frente ao CHIKV em concentração de 99,11µM e ao MAYV na concentração de 85,0µM, foram selecionados para serem ensaiados, juntamente com o controle de vírus, simultaneamente. A tabela 3 e figura 17 demonstram que a substância **E-11** não possui ação virucida sobre o ZIKV, CHIKV e MAYV, uma vez que não houve diferença significativa em relação ao controle de vírus, após titulação em células Vero por UFP/mL, ou seja, o derivado **E-11** atua inibindo as partículas virais após infecção celular pelo vírus, logo a atividade anti-ZIKV, anti-CHIKV e anti-MAYV observada está relacionada com a inibição do ciclo multiplicativo do vírus. Futuros

ensaios podem ser realizados para elucidação dos possíveis mecanismos de ação antiviral da substância **E-11**.

Tabela 3 – Quantificação dos vírus após a avaliação do efeito virucida da substância E-11 contra ZIKV, CHIKV e MAYV.

Ensaio virucida	Média da titulação (UFP/mL)	Log ₁₀ UFP/mL
ZIKV – controle de vírus	1.20×10^5	5.075
11 + ZIKV	1.185×10^5	5.075
CHIKV – controle de vírus	1.55×10^5	5.190
11 + CHIKV	1.135×10^5	5.055
MAYV – controle de vírus	2.165×10^5	5.335
11 + MAYV	1.50×10^5	5.170

Gráfico 2 – Quantificação dos vírus (Log UFP/mL) ZIKV, CHIKV e MAYV, após a avaliação da atividade virucida da substância E-11 (UFP/mL)



ZIKV: controle de vírus (MOI = 10); 11 + ZIKV: substância 11 (56,7μM) incubada com o ZIKV (MOI = 10); CHIKV: controle de vírus (MOI = 10); 11 + CHIKV: substância 11 (99,11μM) incubada com CHIKV (MOI = 10); MAYV: controle de vírus (MOI = 10); 11 + MAYV: substância 11 (85,0μM) incubada com MAYV (MOI = 10)

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os derivados do eugenol avaliados não apresentaram citotoxicidade detectável em células Vero nas concentrações testadas, demonstrando bom perfil de segurança *in vitro*. Dentre as substâncias analisadas, a **E-11** destacou-se por sua ampla atividade antiviral frente aos quatro arbovírus investigados (ZIKV, MAYV, CHIKV e OROV), apresentando os maiores índices de seletividade e potência relativa superior aos controles positivos. A substância **E-21** também apresentou atividade promissora, com destaque para a ação frente ao OROV.

A ausência de efeito virucida direto da substância **E-11** sobre ZIKV, CHIKV e MAYV indica que seu mecanismo de ação ocorre em etapas posteriores à inativação da partícula viral, possivelmente no ciclo de replicação intracelular. Embora os resultados obtidos demonstrem que a substância **E-11** representa um candidato promissor para o desenvolvimento de novos agentes antivirais contra arbovírus, estudos adicionais são necessários para aprofundar a compreensão de seu mecanismo de ação. Nesse contexto, a realização dos ensaios de inibição do efeito citopático e de atividade virucida frente ao OROV permitirá complementar sua caracterização biológica. Além disso, considerando a ausência de atividade virucida frente ao ZIKV, CHIKV e MAYV, torna-se relevante investigar em qual etapa do ciclo replicativo viral ocorre sua ação. Para isso, poderão ser realizados ensaios de adsorção viral, penetração celular e avaliação da atividade antiviral em etapas precoces e tardias do ciclo de multiplicação viral. Esses experimentos permitirão esclarecer se a substância interfere na entrada do vírus na célula hospedeira, na replicação do genoma viral ou em eventos posteriores do ciclo infeccioso. A elucidação desse mecanismo, associada a estudos de otimização estrutural e futuras avaliações *in vivo*, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos destinados ao tratamento das arboviroses.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, n. 1, 2018.

ACRANI, G. O.; GOMES, R.; PROENÇA-MÓDENA, J. L.; et al. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. **Virus Research**, v. 149, p. 56-63, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.013>

ADAPTABRASIL – NCTI. Índice de risco de impacto para arboviroses. Brasília: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2025. Disponível em: [https://adaptabrasil.mcti.gov.br/\(adaptabrasil.mcti.gov.br in Bing\)](https://adaptabrasil.mcti.gov.br/(adaptabrasil.mcti.gov.br in Bing)). Acesso em: 17 maio 2026.

AJMAL, Mohammad; MAHATO, Arun Kumar; KHAN, Mausin; et al. Significance of Triazole in Medicinal Chemistry: Advancement in Drug Design, Reward and Biological Activity. *Chemistry & biodiversity*, v. 21, n. 7, p. e202400637, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38740555/>. Acesso em: 27 July 2026.

ANUMANTHAN, G.; SAHAY, B.; MERGIA, A. Current Dengue Virus Vaccine Developments and Future Directions. **Viruses**, v. 17, n. 212, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/v17020212>.

AOKI-UTSUBO, Chie; CHEN, Ming; HOTTA, Hak. Virucidal and Neutralizing Activity Tests for Antiviral Substances and Antibodies. **Bio-Protocol**, v. 8, n. 10, p. 2855, 2018. DOI: 10.21769/BioProtoc.2855

ARÉCHIGA-PALOMERA, M. A. et al. Putting the Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* (Pisces: Eleotridae) to sleep: effects of clove oil and lidocaine anesthetic. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e271624, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271624>.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099-2109, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31450-2.

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, 2002.

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, p. 469-476, 2010.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portaria GM/MS nº 5.201, de 15 de agosto de 2024. Altera o Anexo 1 do Anexo V à Portaria de Consolidação MS nº 4, de 28 de setembro de 2017, para incluir novas doenças na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos em saúde pública, e modifica o Anexo XLIII à Portaria de Consolidação MS nº 5, de 28 de setembro de 2017. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 19 ago. 2024. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2024/prt5201_19_08_2024.html>. Acesso em: 20 jun. 2026.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Boletim epidemiológico - Zika vírus, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude>. Acesso em: 6 set. 2024.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321-2334, 2016.

CHANDRA, Girish; SINGH, Durg Vijay; MAHATO, Gopal Kumar; et al. Fluorine – a small magic bullet atom in the drug development: perspective to FDA approved and COVID-19 recommended drugs. **Chemical Papers**, v. 77, n. 8, p. 4085–4106, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02804-5>.

CHEN, M.; NIE, Y.-K.; LIU, X.-Y.; LIU, Y.; GUO, D.-Y. Antiviral properties of the natural product eugenol: A review. **Fitoterapia**, v. 185, p. 106674, 2025. DOI: 10.1016/j.fitote.2025.106674

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 2, p. 90–96, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/S2221->

CRUZ, I. L. S.; PIMENTEL, M. A. G.; NASCIMENTO, T. A.; et al. Larvicidal activity and chemical composition of four essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.283724>

CUETO, Ana Paula; ALVES, Sydney Hartz; PILAU, Marciele; WEIBLEN, Rudi; KUBICA,

Thais Felli; LOVATO, Luciane Teresinha. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 41, n. 10, p. 1800-1806, out. 2011.

DAMASCENO, R. O. S.; PINHEIRO, J. L. S.; RODRIGUES, L. H. M.; GOMES, R. C.; DUARTE, A. B. S.; EMÍDIO, J. J.; DINIZ, L. R. L.; SOUSA, D. P. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Eugenol: An Update. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 11, p. 1505, 2024. DOI: 10.3390/ph17111505.

DE SOUZA, A. A. A. et al. Chloroquine and sulfadoxine derivatives inhibit ZIKV replication in cervical cells. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 36, 2020.

DEY, D. et al. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1-22, 2019.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 30, p. 10-15, 2017.

DULBECCO, R. General Properties of Solutions of Linear Elliptic Partial Differential Equations. **Mathematical Survey Series**, v. 38, p. 747, 15 ago. 1952.

ELSHAARAWY, Fathia S.; ABDELHADY, Mohamed I. S.; HAMDY, Wafaa; IBRAHIM, Haitham A. Investigation of the essential oil constituents of *Pimenta racemosa* aerial parts and evaluation of its antiviral activity against HSV-1 and 2. **Trends in Advanced Sciences and Technology**, v. 1, n. 1, p. 6-13, 2024. DOI: 10.62537/2974-444X.1006.

FERNANDES, Ciro Octávio de Souza; FERNANDES, Dayana Rodrigues Amorim de Souza; BARACAT, Rafael Vinícius Marinho; SILVEIRA, Pedro Tadeu de Melo; BRAGA, Gustavo de Oliveira. Arboviroses emergentes e reemergentes no Brasil: dengue, chikungunya e zika. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 6, n. 8, p. 5036-5048, 2024. DOI: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n8p5036-5048>

FERREIRA, D. S. P. et al. Recentes avanços na funcionalização seletiva de quinolinas. **Química Nova**, v. 44, p. 599-615, 2021. DOI: 10.21577/0100-4042.20170701.

FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based drug design. **Burger's**

Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc141.pub2>.

FERREIRA, P. G. et al. Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. **Archives of Virology**, v. 163, n. 6, p. 1567-1576, 2018.

GHASEMI, Mahshid; TURNBULL, Tyron; SEBASTIAN, Sonia; KEMPSON, Ivan. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 12827, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

G1. Com seis casos confirmados em 5 meses, Acre tem aumento de 175 % em casos de febre Mayaro. **G1**, Rio de Janeiro, 28 maio 2025. Disponível em: <https://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2025/05/28/com-seis-casos-confirmados-em-5-meses-acre-tem-aumento-de-175percent-em-casos-de-febre-mayaro.ghtml>. Acesso 22/09/2025.

GLOMB, T.; MINTA, J.; NOWOSADKO, M.; RADZIKOWSKA, J.; ŚWIĄTEK, P. Search for new compounds with anti-inflammatory activity among 1,2,4-triazole derivatives. **Molecules**, v. 29, n. 24, p. 6036, 2024. DOI: 10.3390/molecules29246036.

HAMOUD, M. S.; OSMAN, N. A.; REZQ, S.; ABD EL-WAHAB, H. A.; HASSAN, A. E. A.; ABDEL-FATTAH, H. A.; ROMERO, D. G.; GHANIM, A. M. Design and synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole derivatives as cyclooxygenase-2 inhibitors with anti-inflammatory and antioxidant activity in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. **Bioorganic Chemistry**, v. 124, p. 105808, 2022. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105808.

HASSAN, M. A.; et al. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of eugenol nanoemulsion formed by spontaneous emulsification. **Chemical Papers**, v. 79, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03847-y>.

HEBEEN, K. et al. Synthesis and antitumor evaluation of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidine analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 18, p. 4116-4129, 2019.

HESSLER, G. et al. Relating structure and thermodynamics in drug design: predicting binding affinity and thermodynamic signatures from molecular dynamics simulations. **European**

Journal of Medicinal Chemistry, v. 70, p. 667-678, 2013.

HORVATICH, G. CFF alerta farmacêuticos sobre possibilidade de disseminação da febre do Mayaro no país. 2024. Disponível em: <https://rn.cff.org.br/noticia/Noticias-gerais/15/07/2024/cff-alerta-farmaceuticos-sobre-possibilidade-de-disseminacao-da-febre-do-mayaro-no-pais>. Acesso em: 7 set. 20

INDRAYANTO, Gunawan; PUTRA, Galih Satrio; SUHUD, Farida. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. **Pharmacological Research**, v. 46, p. 273-307, 2021. DOI: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005.24.

KAMIYAMA, N. et al. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. **Antiviral Research**, v. 146, p. 1-11, 2017.

KAUR, R.; KUMAR, K. Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 215, 113220, 2021. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113220.

KINDHAUSER, Mary Kay; ALLEN, Tomas; FRANK, Veronika; et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675–686C, 2016.

KUMAR, S.; MISRA, S. K.; KASHAW, S. K.; KASHAW, V.; KUMAR, A. A comprehensive review on 1,2,4-Triazole: Synthesis, properties and therapeutic potential. **Talanta**, v. 305, p. 129543, 2026.

KUMAR, S., Khokra, SL e Yadav, A. (2021). Análogos de triazol como potenciais agentes farmacológicos: uma breve revisão. **Futur. J. Pharm. Sci.** 7, 106. doi:10.1186/s43094-021-00241-3

LEI, Chengfeng; YANG, Jian; HU, Jia; SUN, Xiulian. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. **Virologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 141-144, 2020. DOI: 10.1007/s12250-020-00230-5.

LIMA, Â. M. A.; TEIXEIRA, R. R.; SILVA, B. F.; SIQUEIRA, R. P.; SILVA, Í. E. P.; SANTOS, E. G.; FERNANDES, M. C.; GONÇALVES, V. H. S.; BRESSAN, G. C.; MENDES, T. A. O.; PAULA, S. O.; COSTA, A. V.; SANTOS, M. H. Síntese e avaliação das atividades

fotoprotetora, citotóxica e antiviral contra o Zika vírus de derivados triazólicos da benzofenona. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 473–484, 2019. DOI: 10.21577/0100-4042.20170365

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, 2016.

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.

LOWE, Rachel; BARCELLOS, Christovam; BRASIL, Patrícia; CRUZ, Oswaldo G.; HONÓRIO, Nildimar Alves; KUPER, Hannah; CARVALHO, Marília Sá. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 96, p. 1-18, 2018. DOI: 10.3390/ijerph15010096.

MACHADO, L. A.; VIVIANI, A. H. S.; CARVALHO, P. H. S.; LIMA, C. S. de. Arboviroses no Brasil: padrões epidemiológicos, impactos em saúde pública e desafios contemporâneos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 11, n. 10, p. 3767–3774, 2025. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v11i10.21375>.

MATIN, M. M.; MATIN, P.; RAHMAN, M. R.; BEN HADDA, T.; ALMALKI, F. A.; MAHMUD, S.; GHONEIM, M. M.; ALRUWAILY, M.; ALSHEHRI, S. Triazoles and Their Derivatives: Chemistry, Synthesis, and Therapeutic Applications. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 864286, 2022. DOI: 10.3389/fmolb.2022.864286.

MORAK-MŁODAWSKA, Beata; JELEŃ, Małgorzata; MARTULA, Emilia; KORLACKI, Rafał. Study of Lipophilicity and ADME Properties of 1,9-Diazaphenothiazines with Anticancer Action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 6970, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24086970>

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

NAPOLEÃO-PEGO, P. et al. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2014.

NAUMENKO, Krystyna; ZAHORODNIA, Svitlana; POP, Calin V.; RIZUN, Nodari. Antiviral activity of silver nanoparticles against the influenza A virus. **Journal of Virus Eradication**, v. 9, p. 100330, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jve.2023.100330>

NGUYEN, Wilson et al, Arthritogenic Alphavirus Vaccines: Serogrouping Versus Cross-Protection in Mouse Models, **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 209–209, 2020.

NUNES, R. B. Síntese de novos derivados do eugenol contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos e avaliação das suas atividades antivirais. 2022. **Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa**, 2022. Disponível em: <https://locus.ufv.br/items/42736de9-2711-4f0a-8644-692ce01128a7>. Acesso em: 22 set. 2025.

OLIVEIRA, Gabriele Nascimento de; SATO, Léo Shigueki; NOVAES, Antonio Henrique Rosas; OLIVEIRA, Natan Nascimento de; LOPES, Luciana Dias Ghiraldi; BERTOLINI, Dennis Armando. Entre o desconhecido e o emergente: mapeando os vírus Oropouche e Mayaro no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 42, e00067525, 2026. DOI: 10.1590/0102-311XPT067525.

OLIVEIRA-JÚNIOR, J. K. et al. Antifungal effect of eugenol on Candida parapsilosis strains isolated from the oral cavity of healthy individuals. **Brazilian Journal of Biology**, v. 85, 2025.

PAGLIARI, Carla; MARCOLI, Geovanna Menezes; KANASHIRO-GALO, Luciane; et al. Dengue haemorrhagic fever: an evaluation of host innates immune factors in hepatic lesions and their correlation with immunopathogenesis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 68, 2026.

PRADO, R. O. F.; MARES, J. A. C.; HERNÁNDEZ, R. J. A.; ZEPEDA, B. J. L.; CARRILLO, D. M. I.; GARCÍA, C. A. C. Emulsions of essential oils in challenged meat with Salmonella enterica subsp. enterica serotype Enteritidis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.77, n.3, e13448, 2025. DOI: 10.1590/1678-4162-13448.

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.

ABREU PEREIRA, Patrícia; ANDRÉ DE SOUZA, Jade; BERNARDES CHAGAS, Luiza; et

al. Chemical composition and antimycotic potential of basil, rosemary, clove and cinnamon essential oils against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Drug Analytical Research**, v. 8, n. 2, p. 25–31, 2024.

PÉRET, Vinícius Augusto Campos; REIS, Adriana Cotta Cardoso; AGOSTINI, Livia da Cunha; PEREIRA, Isadora Oliveira Ansaloni; SILVA, Glenda Nicioli da; CARVALHO, Diogo Teixeira; LAVORATO, Stefânia Neiva; BRAGA, Saulo Fehelberg Pinto; BRANDÃO, Geraldo Célio; SOUZA, Thiago Belarmino de. Benzoxazoles derived from eugenol as potential agents against arboviruses: synthesis, antiviral studies, and mechanistic insights. *ChemMedChem*, v. 20, n. 18, e202500323, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/cmdc.202500323>.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Review of dengue, Zika and chikungunya infections in nervous system in endemic areas. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 81, n. 12, p. 1112-1124, 2023.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. 222. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.

REIS, A. C. C. et al. Anti-Zika virus activity and chemical characterization by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC-DAD-UV-MS) of ethanol extracts in *Tecoma* species. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12906-020-03040-0.

REIS, A. C. C. et al. Antiviral activity and chemical characterization of *Cissus eros* (Vitaceae) ethanol extracts. **Rodriguésia**, v. 71, p. 1-9, 2020. DOI: 10.1590/2175-7860202071052.

REIS, A. C. C. et al. Anti-arboviral activity and chemical characterization of hispidulin and ethanolic extracts from *Millingtonia hortensis* L.f. and *Oroxylum indicum* (L.) Kurz (Bignoniaceae). **Natural Product Research**, v. 37, p. 613-617, 2022. DOI: 10.1080/14786419.2022.2065485.

REIS, A. C. C. Triagem de atividade antiviral in vitro frente a arbovírus de extratos etanólicos de espécies da família Bignoniaceae, *Cissus eros* (Vitaceae) e substâncias isoladas. 2021. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2021.

REIS, Adriana Cotta Cardoso et al. Paulownin triazole-chloroquinoline derivative: a promising antiviral candidate against chikungunya virus. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford University Press, v. 78, n. 7, ovaf092, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1093/lambio/ovaf092>

SILVA, A. S.; RAMOS, C. S. Fenilpropanóides dos óleos essenciais das folhas de *Piper marginatum* sadias e em estresse abiótico. In: **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2011, Recife. Recife: SBQ, 2011.

SILVA, J. L. C.; SANTIAGO, L.; LOPES, J. V.; MONTEIRO, D. C. S.; SOUZA, N. V. Antiviral activity of natural substances against main arboviruses DENV, ZIKV and CHIKV: literature review. **Cuadernos de Administración**, v. 15, n. 7, p. 6765-6780, 2023. DOI: [10.55905/cuadv15n7-050](https://doi.org/10.55905/cuadv15n7-050).

SILVA, K. R. da et al. Density and diversity of Culicidae (Diptera), with analysis of viral circulation, in urban public establishments in Northern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 68, n. 2, 2024.

SILVA, T. F. da. Avaliação in vitro da atividade antiviral da silimarina contra o Zika vírus (Flaviviridae). 2018. 51 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto**, Ouro Preto, 2018.

SOUSA, J. K. T. et al. A chloroquinoline derivative presents effective in vitro and in vivo antileishmanial activity against *Leishmania* species that cause tegumentary and visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 73, 101966, 2019. DOI: [10.1016/j.parint.2019.101966](https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101966).

SOUZA-SILVA, M. V. R. et al. Dados de vida real sobre o uso da hidroxicloroquina ou da cloroquina combinadas ou não à azitromicina em pacientes com Covid-19: uma análise retrospectiva no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 120, n. 9, 2023.

TANG, Q. et al. Identification of dibucaine derivatives as novel potent enterovirus 2C helicase inhibitors: in vitro, in vivo, and combination therapy study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 202, 112310, 2020. DOI: [10.1016/j.ejmech.2020.112310](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112310).

TWENTYMAN, P. R.; 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, 1987.

ULANOWSKA, M.; OLAS, B. Biological properties and prospects for the application of eugenol: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021.

VALE, E. da S. M. do. Formulado de eugenol e seu uso, em condições de laboratório, no controle de *Aedes aegypti* vetor da dengue, chikungunya e zika. 2018. **Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas**, Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2018.

VICIDOMINI, C.; ROVIELLO, V.; ROVIELLO, G. N. Molecular basis of the therapeutical potential of clove (*Syzygium aromaticum* L.) and clues to its anti-COVID-19 utility. **Molecules**, v. 26, n. 1880, p. 1–12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26071880>.

VU, D. M.; JUNGKIND, D.; LA BEAUD, A. D. Chikungunya virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, p. 371-382, 2017. DOI: 10.1016/j.cll.2017.01.008.

WADOOD, M.; ZAFAR, S.; ANWAR, B.; BHATTI, M.; ALI, S.; NIAZ, M.; ALI, M. A. Interlinking Leukemia Cell Lines with Clinicopathological Therapeutics: Exploring Eugenol's Anti-Cancer Potential for Leukemia and Its Types. **Pakistan Journal of Health Sciences**, v. 5, n. 12, p. 339-346, 2024. DOI: 10.54393/pjhs.v5i12.2536

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32-39, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.04.016.

ZARI, Ali T.; ZARI, Talal A. ; HAKEEM, Khalid Rehman. Anticancer Properties of Eugenol: A Review. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7407, 2021.

9. ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO

Letters in Applied Microbiology, 2025, 78(7), ova092
<https://doi.org/10.1093/lambio/ova092>
 Advance access publication date: 3 July 2025
 Research Article

LETTERS IN
 APPLIED
 MICROBIOLOGY

OXFORD
 UNIVERSITY PRESS

Paulownin triazole-chloroquinoline derivative: a promising antiviral candidate against chikungunya virus

Adriana Cotta Cardoso Reis¹, Camila Mendes de Oliveira², Beatriz Carvalho Rangel², Laura Vogas Bonsucesso de Carvalho², Camila Portuneli¹, Livia da Cunha Agostini³, Isadora Oliveira Ansaloni Pereira³, Breno de Mello Silva⁴, Cíntia Lopes de Brito Magalhães⁴, Glenda Nicoli da Silva³, Guilherme Rocha Pereira², Geraldo Célio Brandão^{1,*}

¹Pharmacy School, Department of Pharmacy, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG 35402-163, Brazil

²Department of Physics and Chemistry, Pontifical Catholic University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG 30535-901, Brazil

³Pharmacy School, Department of Clinical Analyses, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG 35402-163, Brazil

⁴Institute of Exact and Biological Sciences, Department of Biological Science, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, MG 35402-163, Brazil

*Corresponding author. Department of Pharmacy, Federal University of Ouro Preto, Morro do Cruzeiro campus, Bauxita, Ouro Preto, MG 35402-163, Brazil.
 E-mail: celiobrandao@ufop.edu.br

Abstract

Viral infections, including arboviruses such as chikungunya, Zika, dengue, and Mayaro fever, remain significant global health and economic challenges, fueled by the emergence and resurgence of mosquito-borne diseases. Natural products, especially plant-derived compounds, have been crucial in drug discovery and often serve as scaffolds for synthetic drug development. This study focused on modifying paulownin, an isolated lignan, through a Click reaction to incorporate 1,2,3-triazole and quinolinic ring frameworks. The resulting derivative **7** was evaluated for its *in vitro* antiviral activity against *Alphavirus chikungunya* (CHIKV). The paulownin derivative **7** did not exhibit cytotoxicity in Vero cells and demonstrated potent activity against CHIKV, with median effective concentration value of 9.05 μ M and a selectivity index exceeding 16.8. Furthermore, compound **7** outperformed positive controls, being over 46 times more active against CHIKV. Cytopathic effect assays confirmed this anti-CHIKV activity. The virucidal assay indicated that the compound does not exert a direct effect on CHIKV particles before cell infection. RT-qPCR studies further demonstrated derivative **7** significantly reduces CHIKV replication. These findings highlight the paulownin derivative **7** as a promising and selective candidate for CHIKV treatment.

Impact Statement

This study highlights the potential of natural product derivatives in addressing global health challenges posed by arboviral infections such as chikungunya fever. We developed substance **7**, a paulownin-based compound with promising antiviral properties by employing innovative molecular modification through Click chemistry. Compound **7** demonstrated selective and potent activity against CHIKV, outperforming positive controls by significantly reducing viral replication through nucleic acid synthesis inhibition. These findings provide a strong foundation for further development of the paulownin derivative **7** as a targeted antiviral therapy, underscoring the importance of natural product-based scaffolds in discovering and advancing novel therapeutic agents.

Keywords: drug discovery; click chemistry; pharmaceuticals; alphavirus; viral replication inhibitor

Introduction

Arboviruses, or arthropod-borne viruses, are a diverse group of >500 pathogens, with ~134 known to cause human diseases, significantly impacting global health (Gubler 2001). The primary arboviruses affecting humans belong to the *Togaviridae* and *Flaviviridae* families, including CHIKV, MAYV, ZIKV, and dengue (Weaver et al. 2018). In recent decades, outbreaks of these mosquito-borne viruses have surged, with >3.1 million cases reported in the Americas (PAHO 2022).

Viral diseases, including those caused by arboviruses, continue to pose a significant public health challenge, despite considerable progress in the development of vaccines, pharmaceuticals, and therapeutics (Malik et al. 2024). Currently, there are no approved specific treatments for arboviruses like chikungunya, Zika, and Mayaro fever, and no licensed prophylactic vaccines, except for the recently authorized IXCHIQ vaccine for CHIKV by the US Food and Drug Administration

(Ly 2024), searching for new antiviral drugs urgent. Natural products, particularly plant-derived compounds, have been a crucial source for drug discovery due to their diverse chemical structures and pharmacological potential (Zhang et al. 2020, Thomas et al. 2021).

Paulownin, a furofuran lignan, has been isolated from various species, including *Tecoma stans* var. *stans* (Reis et al. 2022). Although its antiviral activity remains unexplored, related lignans and their derivatives have shown promise against viruses such as the Tobacco Mosaic Virus (Chi et al. 2023). Additionally, 7-chloroquinoline-based compounds have demonstrated potential in drug development, though chloroquine, tested against CHIKV, was ineffective as a therapeutic agent.

To explore new antiviral candidates, the study focused on modifying paulownin using Click chemistry, specifically copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition

Received 25 February 2025; revised 28 May 2025; accepted 2 July 2025

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press on behalf of Applied Microbiology International. All rights reserved. For commercial re-use, please contact reprints@oup.com for reprints and translation rights for reprints. All other permissions can be obtained through our RightsLink service via the Permissions link on the article page on our site-for further information please contact journals.permissions@oup.com