

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE BIOATIVOS E
MEDICAMENTOS

Gabriel Monteze Ferreira

**Caracterização fitoquímica de frações enriquecidas
com flavonoides e proantocianidinas por CLUE-DAD-
ESI/EM de espécies medicinais do gênero *Ouratea***

Ouro Preto
2018

GABRIEL MONTEZE FERREIRA

**Caracterização fitoquímica de frações enriquecidas
com flavonoides e proantocianidinas por CLUE-DAD-
ESI/EM de espécies medicinais do gênero *Ouratea***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração de Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.

Co-orientador: Gustavo Henrique B. de Souza

Ouro Preto
2018

F368c

Ferreira, Gabriel Monteze.

Caracterização fitoquímica de frações enriquecidas com flavonoides e proantocianidinas por CLUE-DAD-ESI/EM de espécies medicinais do gênero Ouratea [manuscrito] / Gabriel Monteze Ferreira. - 2018.

128f.: il.: color; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

1. Ochnaceae. 2. Viroses. 3. Zika Vírus. 4. Flavonoides. I. Brandão, Geraldo Célio. II. de Souza, Gustavo Henrique Bianco. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.3



LISTA DE PRESENÇA

Sessão de defesa da 138ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **Gabriel Monteze Ferreira**, com a defesa da dissertação intitulada: “Caracterização fitoquímica de frações enriquecidas com flavonoides e proantocianidinas por CLUE-DAD-ESI/EM de espécies medicinais do gênero *Ouratea*”, avaliada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 20 de fevereiro de 2018.

Profª. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
UFLA

Profª. Dra. Andréa Mendes do Nascimento
UFOP

Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão
UFOP

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e por guiar meus passos nesta trabalhosa e desafiadora caminhada.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Márcia Monteze, por sempre acreditarem em mim e por não medirem esforços para me proporcionar o melhor possível, obrigado pelo amor e carinho incondicional e por serem pais e educadores maravilhosos.

Ao meu irmão e amigo Igor Monteze por sempre estar ao meu lado ajudando no que for preciso. Obrigado pela irmandade e carinho de sempre, e também pelas momentos de risadas.

À Lívia por todo carinho, amor e afeto, por ter sido uma companhia ímpar nessa caminhada e por fazer meus dias mais leves e divertidos, sou muito grato a você.

Ao orientador Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão por toda a orientação durante o mestrado, por estar sempre disponível e motivado a me ajudar e contribuir com o seu conhecimento para a nossa pesquisa.

Ao coorientador Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pelas importantes contribuições e correções ao presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Breno Melo e a toda equipe do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismo (LBTM) por ceder o espaço do laboratório para a minha pesquisa e por também contribuírem com o conhecimento.

À Adriana Cotta e Hélia Maria pelo companheirismo e amizade durante o mestrado e também por todo o conhecimento compartilhado.

A todos que contribuíram de alguma forma para esta pesquisa, muito obrigado!

RESUMO

Extratos etanólicos de folhas e caule da espécie *Ouratea castaneifolia*, folhas de *Ouratea spectabilis* e caule de *Ouratea semiserrata*, pertencentes à família botânica Ochnaceae, empregadas para tratamento sintomático de doenças possivelmente relacionadas a infecções virais (critério etnofarmacológico) ou taxonomicamente relacionadas a esta (critério taxonômico) tiveram a atividade citotóxica avaliada pelo método colorimétrico do MTT em linhagem celular Vero. Os extratos foram preparados por percolação exaustiva com EtOH 92,8° GL e submetidos à análise por CCD e Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência de Fase Reversa acoplado a detector Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas (CLUE-FR-DAD-EM). Utilizou-se uma coluna CSH130 C18, detecção no UV (220-400 nm) e sistema de *electrospray ionization* (ESI). Os extratos e suas frações apresentaram citotoxicidade com CC_{50} variando entre 12,7µg/mL a 586,5 µg/mL. Nas análises por CCD e CLUE-FR detectou-se a presença de triterpenos, esteroides, flavonoides e taninos. Análises por CLUE-MS dos extratos permitiram a identificação parcial de flavonoides majoritários e proantocianidinas entre eles: Vitexina, Orientina, Luteolina-7-O-glicuronídeo, Luteolina-7-O-rutinosídeo, Lanaraflavona, 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona, hinokiflavona, Amentoflavona, 7'',4''-di-O-metil-amentoflavona, 7,7''-di-O-metil-amentoflavona, 4',4'',7,7''-tetra-O-metil-amentoflavona, 7-O-metilrobustaflavona, 7,7''-di-O-metilagathisflavona e 6,6''-bigenkwanina, rutina, (epi)-catequina, (epi)-catequina-(epi)-catequina, (epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina e (epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina. Os extratos foram testados através de ensaio antiviral pelo método colorimétrico do MTT contra Zika vírus (ZIKAV), apresentando valores de concentração efetiva a 50% (CE_{50}) que variou de 35,13 a 312,7µg/mL demonstrando que estes extratos são potenciais fontes de substâncias antivirais.

Palavras chave: citotoxicidade; família Ochnaceae; Atividade antiviral, *Zika vírus*.

ABSTRACT

The ethanol extracts of leaves and stem from the species *Ouratea castaneifolia*, *Ouratea spectabilis* and *Ouratea semiserrata* which belong to the family of the Ochnaceae, employed to the treatment of diseases possible caused by viral infection (ethnopharmacological criteria) or taxonomically related to this family (taxonomic criteria) had their cytotoxic activity evaluated by the MTT colorimetric method for Vero cells. The extracts were prepared by exhaustive percolation with ethanol 92,8° GL and analysed by TLC (Thin Layer Chromatography) and Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Detector Diodes Array and Mass Spectrometer (UPLC-RP-DAD-MS). The UPLC analysis were performed at 40°C with a CSH130 C18 column, detection by UV (220-400) and Electrospray Ionization (ESI). It extracts and fractions showed cytotoxicity varying the CC₅₀ from 12.7 to 586.5 µg/mL for Vero cells. The TLC and RP-UPLC analysis detected the presence of triterpenes, steroids, flavonoids e tannins. The UPLC-MS analysis were able to partially identify that the main flavonoids and proanthocyanidin in the extracts are being Vitexin, Orientin, Luteolin-7-O-glucuronide, Luteolin-7-O-rutinoside, Lanaraflavone, 7,4'''-di-O-methyl-lanaraflavone, hinokiflavone, Amentoflavone, 7'',4'''-di-O-methyl-amentoflavone, 7,7''-di-O-methyl-amentoflavone, 4',4''',7,7''-tetra-O-methyl-amentoflavone, 7-O-methylrobustaflavone, 7,7''-di-O-methylagathisflavone, 6,6''-bigenkwanin, Rutin, (epi)-catechin, (epi)-catechin-(epi)-catechin, (epi)-catechin-(epi)-catechin-(epi)-catechin and (epi)-catechin-(epi)-catechin-(epi)-catechin-(epi)-catechin. The extracts antiviral activity against Zika vírus (ZIKAV) were tested by the MTT assay, showing Effective Concentration 50% (EC₅₀) varying from 35,13µg/mL to 312,7µg/mL demonstrating these extracts are potential sources of antiviral substances.

Key words: Cytotoxicity, Ochnaceae family, Antiviral activity, *Zika virus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Porcentagem das moléculas de origem natural aprovadas pela FDA entre 1981 e 2014 nos EUA (Legenda: N = Produto Natural Inalterado; NB = Fármaco Botânico; ND = Derivado de Produto Natural; S* = Fármaco sintético).....	22
FIGURA 2 - Estrutura básica dos flavonoides e algumas classificações segundo a estrutura química (Adaptado de RIJKE <i>et al</i> , 2006; DORNAS <i>et al</i> , 2009).....	23
Figura 3 – Estrutura molecular dos flavonoides Glabranina, 7-O-metilglabranina, Quercetina e Baicaleína (Adaptado de SANCHEZ <i>et al</i> , 2000; VRIJSEN <i>et al</i> , 1988).....	24
Figura 4 – Estrutura molecular dos flavonoides Agathisflavona e 7''-metil-agathisflavona (Adaptado de SANCHEZ <i>et al</i> , 2000; VRIJSEN <i>et al</i> , 1988).....	26
Figura 5: Esquema da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas de <i>O. castaneifolia</i> e <i>O. spectabilis</i> . (DCM – Diclorometano; AcOEt – Acetato de Etila; MeOH – Metanol).....	30
Figura 6: Esquema do refractionamento da fração DCM da espécie <i>O. castaneifolia</i>	33
Figura 7 – Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada para atividade antiviral frente ao ZIKV pelo método colorimétrico do MTT.....	41
Figura 8: Representação esquemática da placa de 6 poços utilizada para ensaio antiviral para confirmação de efeito protetor por fotografia por microscopia óptica.....	42

Figura 9: Fluxograma resumindo as etapas realizadas com o extrato etanólico de <i>Ouratea castaneifolia</i> para a obtenção de frações enriquecidas com flavonoides.....	43
Figura 10: Fluxograma resumindo as etapas realizadas com o extrato etanólico de <i>Ouratea spectabilis</i> para a obtenção de frações enriquecidas com flavonoides.....	43
Figura 11: Cromatograma por CLUE-UV do extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i>	51
Figura 12: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ <i>FullScan</i> do extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i>	52
Figura 13: Cromatograma por CLUE-UV do extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea spectabilis</i>	53
Figura 14: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ <i>FullScan</i> do extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea spectabilis</i>	54
Figura 15: Cromatograma por CLUE-UV do extrato etanólico de caule <i>Ouratea semiserrata</i>	55
Figura 16: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ <i>FullScan</i> do extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semiserrata</i>	56
Figura 17: Reação de retro-Diels Alder em flavonoides (MARKHAM, 1989).....	58
Figura 18: Flavonas encontradas no extrato etanólico de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	59
Figura 19: Estruturas das flavonas e flavonol encontradas nos extratos de <i>Ouratea</i> por UPLC-UV-MS no presente trabalho.....	60
Figura 20: Proposta de fragmentações da vitexina.....	62

Figura 21: Proposta de fragmentações da luteolina-7-rutinosídeo.....	63
Figura 22: Proposta de fragmentações da Rutina.....	64
Figura 23: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ da substância com T _R 2,4min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i> relacionado ao flavonol Rutina.....	65
Figura 24: Espectro de ultravioleta da substância com T _R 2,4min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i> relacionado ao flavonol Rutina.....	66
Figura 25: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ da substância com T _R 2,64min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i> relacionado à flavona Vitexina.....	67
Figura 26: Espectro no ultravioleta da substância com T _R 2,64min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i> relacionado à flavona Vitexina.....	68
Figura 27: Espectro de massa MS ² -ESI ⁻ da substância com T _R 2,79min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> relacionada à flavona luteolina-7-O-rutinosídeo.....	69
Figura 28: Espectro no ultravioleta da substância com T _R 2,79min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> relacionado à flavona luteolina-7-O-rutinosídeo.....	70
Figura 29: Estruturas dos biflavonoides com ligação C-O encontrados no extrato etanólico de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	72

Figura 30: Dados encontrados experimentalmente por CLUE-UV-EM para biflavonoides com ligação C-O.....	73
Figura 31: Proposta de fragmentações da 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona.....	74
Figura 32: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ da substância com T _R de 6,8min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> relacionado ao biflavonoide 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona.....	75
Figura 33: Espectro no ultravioleta da substância T _R de 6,8min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> relacionado ao biflavonoide 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona.....	76
Figura 34: Biflavonoides com ligação IC3'-IIC8'' e IC3'-IIC6'' encontrados no extrato etanólico de folhas de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	78
Figura 35: Dados encontrados experimentalmente por CLUE-UV-EM para biflavonoides com ligação IC3'-IIC8'' e IC3'-IIC6'' detectados nos extratos etanólicos de folhas de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	79
Figura 36: Biflavonoides com ligação IC6 – IIC8'' e IC6 – IIC6'' encontrados no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e <i>Ouratea spectabilis</i>	80
Figura 37: Proposta de fragmentações da 7,7''-di-O-metilamentoflavona.....	81
Figura 38: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ dos isômeros I e II identificados no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e <i>Ouratea spectabilis</i> relacionado aos biflavonoides 7,7''-di-O-metilamentoflavona, 7,7''-di-O-metilagathisflavona e 6,6''-bigenkwanina.....	82
Figura 39: Espectro no ultravioleta dos isômeros identificado no extrato etanólico das espécies do gênero <i>Ouratea</i> relacionado ao biflavonoide 7,7''-di-O-metilamentoflavona, 7,7''-di-O-metilagathisflavona e 6,6''-bigenkwanina.....	83

Figura 40: Proposta de fragmentações da 7-O-metilrobustaflavona.....	84
Figura 41: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ da substância com T _R 5,8min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e <i>Ouratea spectabilis</i> relacionado ao biflavonoide 7-O-metilrobustaflavona.....	85
Figura 42: Espectro no ultravioleta da substância com T _R 5,8min presente no extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i> e <i>Ouratea spectabilis</i> relacionado ao biflavonoide 7-O-metilrobustaflavona.....	86
Figura 43: Proposta de fragmentações da 7,7''-di-O-metilagathisflavona.....	87
Figura 44: Proposta de fragmentações da 6,6''-bigenkwanina.....	88
Figura 45: Estrutura molecular, espectro no UV e espectro de massa ESI ⁻ para a substância de MM 290Da presente no extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semiserrata</i>	92
Figura 46: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ para a substância de MM 290Da presente no extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i>	93
Figura 47: Estrutura molecular de proantocianidina B detectada em extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semiserrata</i>	94
Figura 48: Proposta de fragmentação para os isômeros de MM 578Da presente no extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semiserrata</i>	95
Figura 49: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ dos isômeros de MM 577Da presente no extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semiserrata</i>	96
Figura 50: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ dos isômeros de MM 865Da presente no extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semiserrata</i>	98
Figura 51: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ dos isômeros de MM 865Da presente no extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i>	99

Figura 52: Proposta de fragmentação para os isômeros de MM 866Da presente no extrato etanólico de caule de <i>Ouratea semisserrata</i>	100
Figura 53: Espectro de massa EM ² -ESI ⁻ da substância de MM 1154Da presente no extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semisserrata</i>	101
Figura 54: Proposta de fragmentação para a substância de MM 1154 Da presente no extrato etanólico de caules de <i>Ouratea semiserrata</i>	102
Figura 55 – Efeito protetor realizado pelo extrato de caule de <i>Ouratea semiserrata</i> em células Vero infectadas por ZIKV em um período de 72h (1 e 5. Controle de células; 2e 6. Controle do extrato; 3 e 7. Controle Viral; 4e 8. Células infectadas com vírus e tratada com extrato).....	113
Figura 56 - Efeito protetor realizado pela Rutina em células Vero infectadas por ZIKV em um período de 72h (1. Controle de células; 2. Controle do extrato; 3. Controle Viral; 4. Células infectadas com vírus e tratada com extrato).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Registros de exsicata de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	29
Tabela 2 – Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos e frações por CLUE-FR.....	32
Tabela 3: Rendimento extrativo do material vegetal de espécies do gênero <i>Ouratea</i>	45
Tabela 4: Rendimentos das frações obtidas da partição líquido-líquido de espécies do gênero.....	45
Tabela 5: Frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i>	46

Tabela 6: Resumo mostrando em qual espécie vegetal cada composto foi identificado.....	49
Tabela 7: Compostos majoritariamente identificados nas frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel.....	89
Tabela 8: Valores de CC ₅₀ calculados através do ensaio colorimétrico do MTT para cada extrato e suas partições.....	105
Tabela 9: Valores de CC ₅₀ calculados através do ensaio colorimétrico do MTT para frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de <i>Ouratea castaneifolia</i>	106
Tabela 10 – Valores de citotoxicidade (Vero) e atividade antiviral de extratos etanólicos de espécies de <i>Ouratea</i> e suas partições frente ao ZIKV pela técnica colorimétrica do MTT.....	108
Tabela 11 - Valores de citotoxicidade (Vero) e atividade antiviral de frações obtidas de <i>Ouratea castaneifolia</i> , por cromatografia em coluna de sílica gel, frente ao ZIKV pela técnica colorimétrica do MTT.....	110
Tabela 12 – Efeito protetor apresentado por alguns extratos vegetais e frações frente ao efeito citopático do ZIKV, analisado pela técnica colorimétrica do MTT.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
CE ₅₀	Concentração efetiva a 50%
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
DAD	Detector arranjo de diodo
DCM	Diclorometano
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO ₄₉₀	Densidade ótica a 490nm
EM	Espectrometria de massas
EM/EM ou EM ²	Espectrometria de massas sequencial
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EtOH	Etanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	Fase reversa
HRF	<i>Heterocyclic ring fission</i>
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
NP-PEG	Produto natural - polietilenoglicol
PBS	Solução salina-fosfato tamponada
QM	Quinonemetideo
RDA	retro-Diels-Alder
SFB	Soro fetal bovino
UV	Ultravioleta
Vero	Células de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
WHO	<i>World Healthy Organization</i>
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Reagente/solventes utilizados.....	28
4.2 Aparelhos utilizados.....	28
4.3 Coleta do material vegetal.....	29
4.4 Preparo dos extratos.....	29
4.5 Partição dos extratos brutos de <i>Ouratea castaneifolia</i> e <i>Ouratea spectabilis</i>	29
4.6 Análise fitoquímica dos extratos etanólicos brutos das espécies <i>Ouratea castaneifolia</i> (folhas), <i>Ouratea spectabilis</i> (folhas), <i>Ouratea semiserrata</i> (caule) e suas frações.....	31
4.7 Obtenção de perfis cromatográficos por CLUE-FR-DAD-EM.....	31
4.8 Fracionamento da fração diclorometano obtida do extrato etanólico de <i>Ouratea castaneifolia</i>	32
4.9 Ensaios <i>in vitro</i> para atividade citotóxica e antiviral.....	34
4.9.1 Linhagens celulares.....	34
4.9.2 Soluções e meios de cultura.....	34
4.9.3 Procedimento de cultivo.....	35
4.9.4 Técnica colorimétrica do MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina.....	36
4.9.5 Análise estatística dos dados.....	36
4.9.6 Vírus.....	37
4.9.7 Preparo da suspensão viral.....	37
4.9.8 Titulação viral em placa de 6 poços.....	37
4.9.9 Titulação em placa de 96 poços.....	38
4.9.10 Ensaio de atividade antiviral pelo método colorimétrico do MTT.....	38

4.9.11 Ensaio de atividade antiviral pelo método colorimétrico do MTT em placa de 6 poços.....	41
4.9.12 Resumo metodologia.....	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Obtenção dos extratos etanólicos das espécies <i>Ouratea castaneifolia</i> , <i>Ouratea spectabilis</i> e <i>Ouratea semiserrata</i>	45
5.2 Fracionamento da fração diclorometano de <i>Ouratea castaneifolia</i> por cromatografia em coluna de sílica gel.....	46
5.3 Identificação de constituintes fenólicos nos extratos etanólicos de <i>Ouratea castaneifolia</i> , <i>Ouratea spectabilis</i> , <i>Ouratea semiserrata</i> e suas fração.....	48
5.4 Flavonoides.....	57
5.5 Flavonas e Flavonóis.....	58
5.5.1 Vitexina.....	61
5.5.2 Luteolina-7-O-rutinosídeo.....	62
5.5.3 Rutina.....	63
5.6 Biflavonoides.....	71
5.6.1 Biflavonoides ligados por C – O.....	71
5.6.2 Biflavonoides ligados por C – C	77
5.6.2.1 Biflavonoides ligados por IC3' – IIC8'' e IC3' – IIC6''	77
5.6.2.2 Biflavonoides ligados por IC6 – IIC8'' e IC6 – IIC6''	80
5.7 Substâncias detectadas nas frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano do extrato etanólico de folhas de <i>Ouratea castaneifolia</i>	89
5.8 Proantocianidinas.....	91
5.9 Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT.....	103
5.10 Ensaio antiviral.....	107
6 CONCLUSÃO.....	115
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
8 ANEXO I.....	128

1 INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV) pertence à família Flaviridae e ao gênero *Flavivirus*, assemelhando-se evolutivamente com outros arbovírus transmitidos por mosquito, como o vírus da Dengue e da Febre Amarela. Trata-se de um vírus de RNA de cadeia simples que atualmente são conhecidas duas linhagens, uma africana e outra asiática. (HADDOW *et al*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Sua transmissão se dá por meio dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e as principais manifestações clínicas são febre, dores musculares, dores nos olhos, prostração e erupção maculopapular, porém, são predominantemente leves e assintomáticas (FAUCI e MORENS, 2016; GRARD *et al*, 2014; SAXENA *et al*, 2016; ZANLUCA *et al*, 2015).

Até o momento não há nenhum fármaco em uso clínico para o tratamento de infecção pelo ZIKV, apenas tratamento para os sintomas da doença. Durante as últimas décadas, houve uma maior atenção dos pesquisadores voltada para os produtos naturais derivados de plantas a fim de identificar e isolar compostos que possam apresentar atividade contra infecções virais como a dengue e o ZIKV, com base em práticas médicas tradicionais (BARROWS *et al*, 2016; TEIXEIRA *et al*, 2014; KADIR *et al*, 2013).

Uma classe de metabólitos secundários de origem vegetal que possui atividade antiviral já descrita na literatura são os flavonoides (ROMING *et al*, 1992; SANCHÉZ *et al*, 2000; ZANDI *et al*, 2012). Os flavonoides são substâncias fenólicas ou polifenólicas, biossintetizada a partir da via do ácido chiquímico e da via do acetato. De acordo com suas estruturas podem ser classificados em: flavonas, flavonóis, antocianidinas, chalconas, isoflavonas, dihidroflavonoides, flavanona, isoflavonoides e biflavonoides (SIMÕES, 2001).

No âmbito da pesquisa por flavonoides com atividade contra o ZIKV, pode-se destacar a família botânica *Ochnaceae*, caracterizada como uma das principais fontes de biflavonoides na natureza e até o momento podemos salientar os gêneros *Lophira*, *Luxemburguia*, *Ochna* e *Ouratea*, sendo a última o maior gênero desta família que compreende aproximadamente 300 espécies

tropicais que aparecem principalmente na América do Sul e África tropical. Esta família compreende em 27 gêneros e 600 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais espalhadas pelo mundo. No Brasil, são encontradas aproximadamente 120 espécies (SALVADOR *et al*, 2010). O gênero *Ouratea* é fonte de flavonoides e biflavonoides, onde os biflavonoides podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos deste gênero (NASCIMENTO, 2008).

A literatura científica apresenta diversos estudos demonstrando atividade antiviral dos extratos de espécies do gênero *Ouratea* e também de flavonoides isolados deste mesmo gênero, por exemplo, a agathisflavona e 7"-metil-agathisflavona obtidos da *Ouratea parviflora*. Isso torna a classe dos flavonoides uma ferramenta muito promissora nas pesquisas antivirais. Neste sentido, este projeto foi fundamentado no histórico de atividade antiviral das espécies do gênero *Ouratea*, em especial à classe dos flavonoides.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O Zika vírus (ZIKV) pertence à família Flaviridae e ao gênero *Flavivirus*, assemelhando-se evolutivamente com outros arbovírus transmitidos por mosquito, como o vírus da Dengue e da Febre Amarela. Trata-se de um vírus de RNA de cadeia simples que atualmente são conhecidas duas linhagens, uma africana e outra asiática. (HADDOW *et al*, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Sua transmissão se dá por meio de mosquitos do gênero *Aedes*. As principais espécies transmissoras são *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, encontrados em zonas tropicais, subtropicais e zonas temperadas respectivamente. (GRARD *et al*, 2014).

O vírus foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda e o primeiro caso de infecção humana detectado neste mesmo país em 1952 e logo em seguida, surtos foram reportados em todo o país. Em 2007 houve o principal surto de infecção pelo ZIKV, ocorrido na ilha YAP nos Estados Federados da Micronésia onde aproximadamente 75% da população foi infectada pelo vírus (AGGARWAL *et al*, 2017). Em seguida, também houve epidemia na Polinésia Francesa entre 2013 e 2014, com uma estimativa de 28.000 casos, aproximadamente 11% da população (ECDC, 2014). O primeiro caso confirmado no Brasil foi registrado em maio de 2015. As manifestações clínicas são similares a Dengue, como febre, dores musculares, dores nos olhos, prostração e erupção maculopapular. Frequentemente a febre é baixa, porém em alguns casos relatados no Brasil, houve febre elevada próxima de 39 °C. Geralmente a duração da febre ocorre de três a cinco dias. A infecção pelo ZIKV é predominantemente leve e assintomática (FAUCI e MORENS, 2016; SAXENA *et al*, 2016; ZANLUCA *et al*, 2015).

Até o momento, não existem *Kits* comerciais de diagnóstico de infecção pelo ZIKV, o que torna bastante restrito o seu diagnóstico em um paciente infectado. O método mais sensível e específico para diagnosticar infecção por ZIKV é a detecção de genomas virais pela técnica de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*), contudo, ainda se trata de uma técnica que pode gerar falso-negativo. Não existem vacinas e nem

medicamentos específicos para a infecção pelo ZIKV, apenas tratamento dos sintomas, feito pelo uso de analgésicos e antipiréticos (LUZ *et al*, 2015; NELWAN *et al*, 2014; WHITEHORN *et al*, 2015).

A prevenção mais recomendada é tomar medidas que dificultem a reprodução do vetor *Aedes aegypti* no ambiente doméstico. Como o mosquito se reproduz em água limpa e parada, recomenda-se evitar estes possíveis criadouros em vasos de plantas, garrafas, calhas entupidas e outros objetos que favoreçam o acúmulo de água (SES-MG, 2018). Outras medidas para prevenir a picada do mosquito é usar roupas mais longas em lugares em que haja circulação do vetor, também fazer uso de telas em janelas para evitar a entrada do mosquito na residência. Gestantes devem evitar viajar para países com surtos de infecção pelo ZIKV e viajantes que irão a países com surto devem tomar precauções como o uso de repelentes, e viajantes que estão retornando dessas áreas de surtos para o país de origem devem estar atentos ao surgimento dos sintomas, e em caso de aparecimento, relatar à autoridade sanitária competente (AGGARWAL *et al*, 2017)

Durante o surto de ZIKV em alguns países, também houve concomitante aumento de casos de desordens neurológicas como a microcefalia em recém-nascidos e Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Após pesquisas e evidências científicas com mulheres grávidas infectadas com o ZIKV, foi confirmado que a infecção pelo vírus durante a gestação é uma potencial causa de microcefalia em neonatos, como mostra a Organização Mundial da Saúde. Já a *Centers for Disease Control* confirma essa relação. (CALVET *et al*, 2016; CDC, 2016; OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2016; RASMUSSEN *et al*, 2016; WHO, 2016).

A SGB é frequentemente precedida por uma infecção bacteriana ou viral. Há fortes evidências científicas sugerindo que a infecção viral pelo ZIKV pode provocar a SGB, porém, apenas uma pequena parcela de pessoas com infecção recente pelo Zika vírus contrai a síndrome. (WHO, 2016; CDC, 2016; BRASIL *et al*, 2016; FIOCRUZ, 2016).

Em 2016 registrou-se 216.207 casos prováveis de febre por infecção de ZIKV no Brasil, com 8 mortes confirmadas laboratorialmente. Em

2017, até a semana epidemiológica 50 (01/01/2017 a 16/12/2017) registrou-se 17.338 casos prováveis de febre por infecção de ZIKV, com 50,2% de casos confirmados e taxa de incidência de 8,4 casos por cem mil habitantes. Confirmou-se 2 óbitos, um em São Paulo e outro em Rondônia (SVS - MS, 2018).

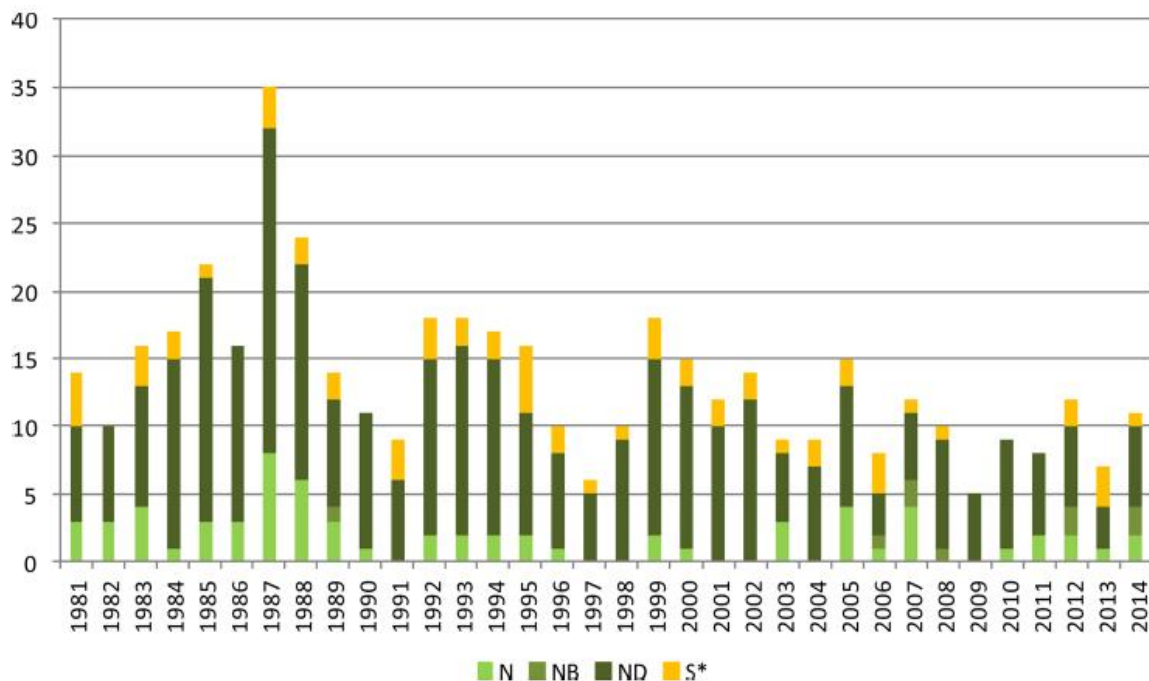
Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, entre 08/11/2015 e 04/11/2017 notificou-se 14.916 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo Zika vírus e outras etiologias infecciosas (SVS – MS, 2018). No estado de Minas Gerais, no ano de 2017 registrou-se 754 casos prováveis de infecção pelo ZIKV (SES-MG, 2018).

Até o momento não há nenhum fármaco em uso clínico para o tratamento de infecção pelo ZIKV, apenas tratamento para os sintomas da doença. Durante as últimas décadas, houve uma maior atenção dos pesquisadores voltada para os produtos naturais derivados de plantas a fim de identificar e isolar compostos que possam apresentar atividade contra infecções virais como a dengue e o ZIKV, com base em práticas médicas tradicionais (BARROWS *et al*, 2016; TEIXEIRA *et al*, 2014; KADIR *et al*, 2013).

No contexto dos estudos em produtos naturais, o Brasil se destaca por possuir aproximadamente 55 mil espécies vegetais, 22% do total registrado no planeta. Pelo fato do Brasil possuir vasta extensão territorial e estar localizado em posição geográfica, onde ocorre a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, isso o torna um alvo bastante cogitado para a pesquisa na área da Química de Produtos Naturais (QPN) (PINTO *et al*, 2002).

Nos EUA, no ano de 2014, 10 das 44 moléculas com atividade farmacológica aprovadas pela FDA são de origem natural e/ou inspiradas em uma estrutura de origem natural. A figura 1 apresenta a porcentagem dessas moléculas de origem natural aprovadas pela FDA entre 1981 e 2014 nos EUA (CRAGG e NEWMAN, 2015)

Figura 1 - Porcentagem das moléculas de origem natural aprovadas pela FDA entre 1981 e 2014 nos EUA (Legenda: N = Produto Natural Inalterado; NB = Fármaco Botânico; ND = Derivado de Produto Natural; S* = Fármaco sintético) (CRAGG e NEWMAN, 2015)



Uma classe de metabólitos secundários de origem vegetal que possui atividade antiviral já descrita na literatura são os flavonoides (ROMING *et al*, 1992; SANCHÉZ *et al*, 2000; ZANDI *et al*, 2012). Os flavonoides são substâncias fenólicas ou polifenólicas, biossintetizada a partir da via do ácido chiquímico e da via do acetato.

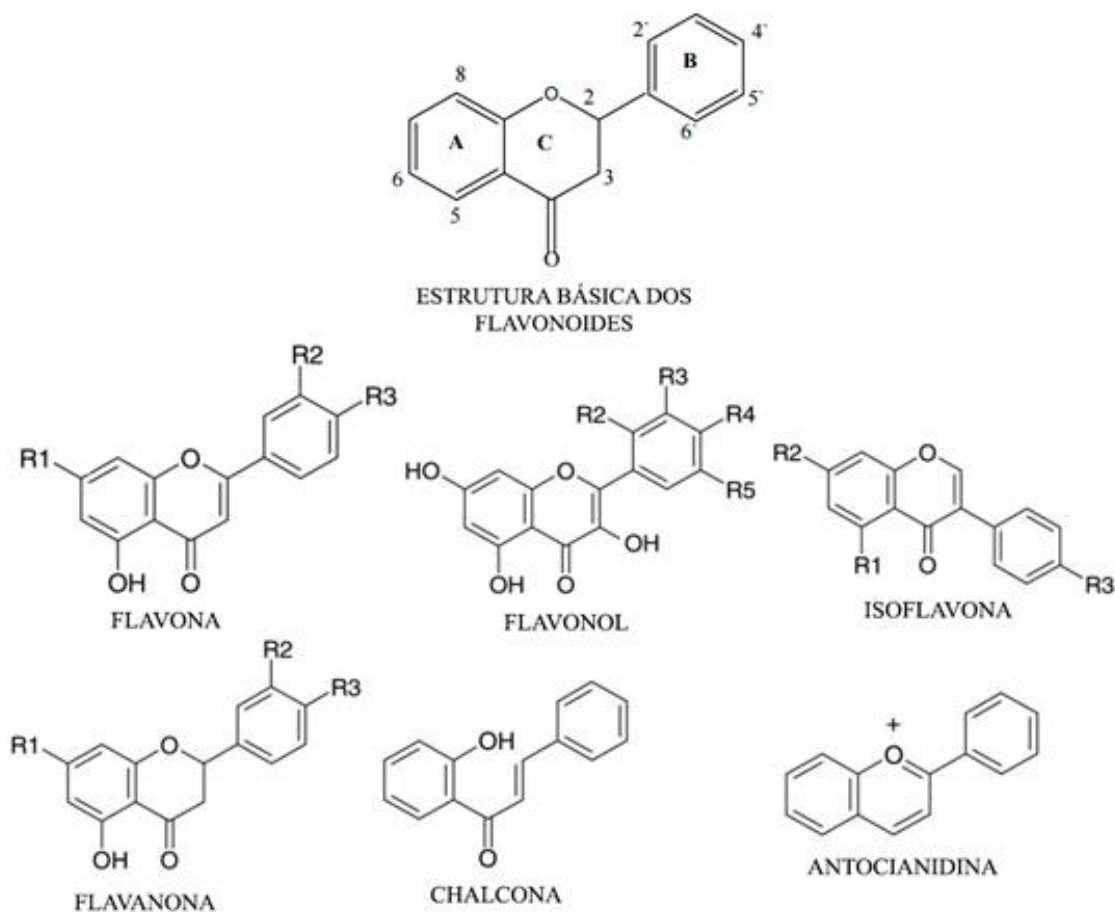
São extensamente difundidos pelo reino vegetal, apresentando o máximo de diversidade nas angiospermas. Encontrados em frutas, legumes, sementes e em alimentos como o vinho tinto. São responsáveis pela cor dos vegetais que pode variar do branco ao azul-púrpura (BRUNETON, 2001; DEWICK, 2002; SIMÕES, 2001).

Em seu núcleo fundamental, constituído de 15 átomos de carbonos, possuem duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas (Figura 2). Os flavonoides de origem natural podem ser encontrados na forma oxigenada ou conjugados a açúcares, estas últimas são chamadas de heterosídeos. De acordo com suas estruturas podem ser classificados em:

flavonas, flavonóis, antocianidinas, chalconas, isoflavonas, di-hidroflavonoides, flavanona, isoflavonoides e biflavonoides (SIMÕES, 2001).

Os flavonoides são comumente detectados utilizando absorção no ultravioleta (UV). Flavonas e flavonóis exibem dois máximos de absorção característicos, que é observado comumente entre 300 a 380nm (Banda I) e 240 a 280nm (Banda II). Também é utilizada a ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono para a elucidação estrutural desses metabólitos secundários (MABRY, 1970).

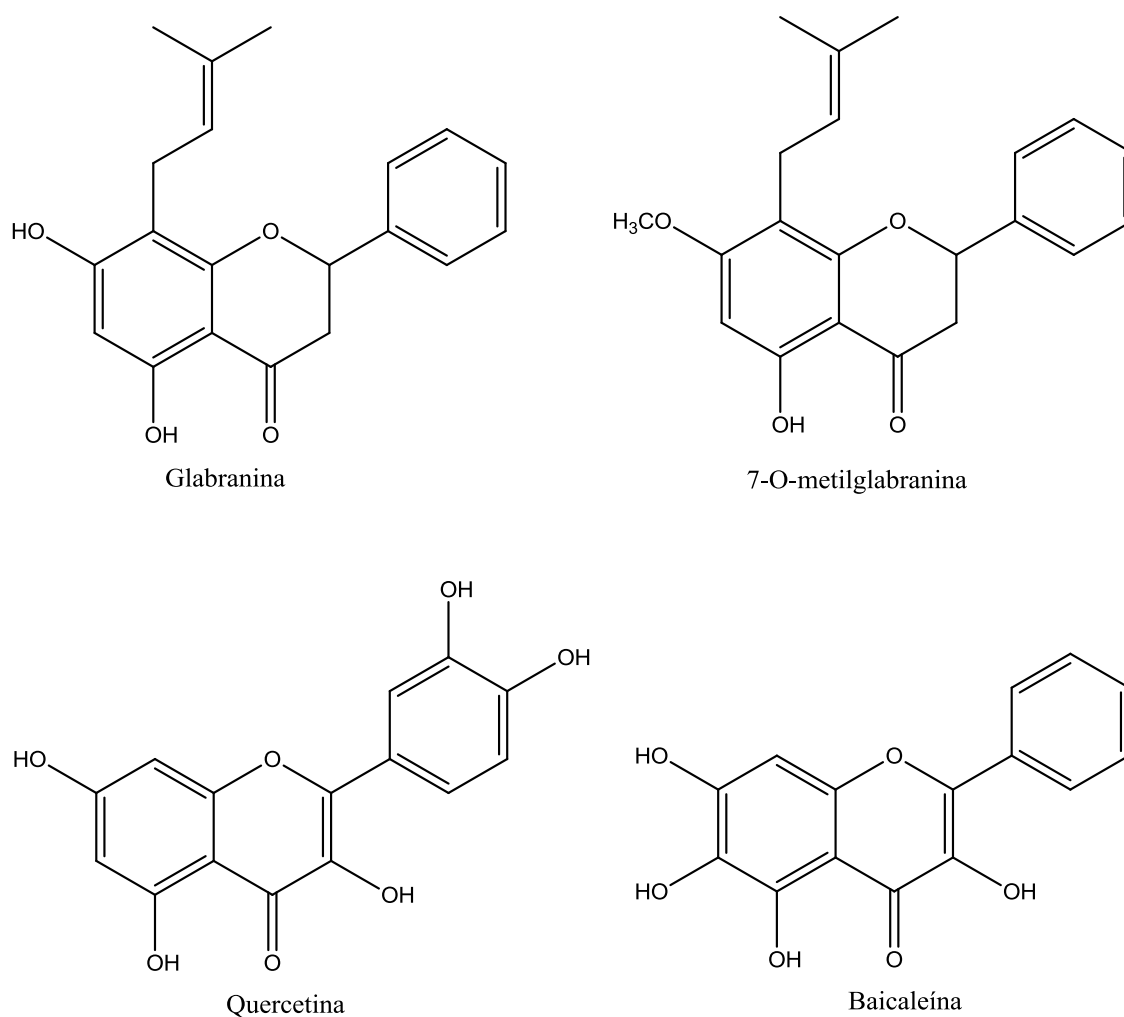
Figura 2 – Estrutura básica dos flavonoides e algumas classificações segundo a estrutura química (Adaptado de RIJKE *et al*, 2006; DORNAS *et al*, 2009)



Na literatura são citados flavonoides que possuem ação antiviral como, por exemplo, a glabranina e a 7-O-metilglabranina (Figura 3). Os dois compostos foram avaliados *in vitro* pelo ensaio de placa utilizando células LLC-MK2 (Rim de *macaca mulata*) e o sorotipo DENV-2. Ambas apresentaram 70% de inibição de infecção viral a 25 µmol/L (SANCHÉZ *et al*, 2000).

O flavonoide quercetina (Figura 3) apresenta atividade *in vitro* com concentração efetiva a 50% (CE₅₀) de 35,7 µg/mL contra infecção de DENV-2 em células do rim de Macaco Verde Africano (Vero cells) (ZANDI *et al*, 2011). Já o flavonoide Baicaleína (Figura 3) apresenta inibição da replicação de DENV-2 em células Vero com CE₅₀ = 6,46 µg/mL quando adicionado após a absorção viral nas células (ZANDI *et al*, 2012).

Figura 3 – Estrutura molecular dos flavonoides Glabranina, 7-O-metilglabranina, Quercetina e Baicaleína (Adaptado de SANCHEZ *et al*, 2000; VRIJSEN *et al*, 1988)



A família *Ochnaceae* é caracterizada como uma das principais fontes de biflavonoides na natureza e até o momento podemos destacar os gêneros *Lophira*, *Luxemburquia*, *Ochna* e *Ouratea*, sendo a última o maior gênero desta família que compreende aproximadamente 300 espécies tropicais que aparecem principalmente na América do Sul e África tropical . Esta família compreende em 27 gêneros e 600 espécies encontradas em regiões tropicais e

subtropicais espalhadas pelo mundo. No Brasil, são encontradas aproximadamente 120 espécies (SALVADOR *et al*, 2010). O gênero *Ouratea* é fonte de flavonoides e biflavonoides, onde os biflavonoides podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos deste gênero (NASCIMENTO, 2008).

Trabalho realizado por Roming *et al* em 1992 observou atividade antiviral do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Ouratea lucens* contra *Herpes virus 1* (HSV-1) e 2 (HSV-2) e o extrato com éter de petróleo da mesma espécie também apresentou atividade contra HSV-1. O extrato etanólico também apresentou atividade contra o vírus da estomatite vesicular (VSV).

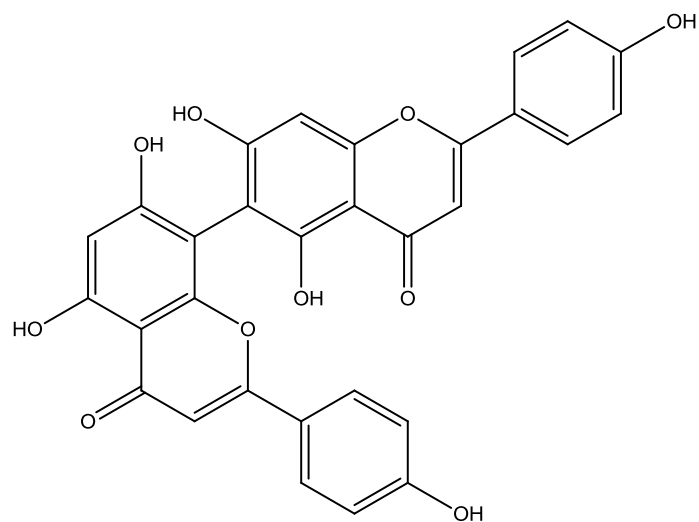
Os extratos etanólicos das espécies *Ouratea castaneifolia*, *Ouratea semiserrata* e *Ouratea spectabilis* são fontes de agentes antivirais. O extrato das folhas de *O. spectabilis* demonstrou atividade contra HSV-1, com concentração efetiva 50% (CE₅₀) menor que 50 µg/mL, enquanto a *O. castaneifolia* e *O. semiserrata* apresentaram atividade moderada contra o mesmo vírus (EC₅₀ entre 56,5 e 97,24 µg/mL). Os extratos dessas mesmas espécies também exibiram atividade inibitória da replicação do vaccínia vírus (VACV), vírus causador da varíola. *O. castaneifolia* e *O. semiserrata* exibiram ação contra o vírus da encefalomiocardite murina (EMCV) (BRANDÃO *et al*, 2011).

Os flavonoides agathisflavona e 7"-metil-agathisflavona (Figura 4) obtidos da *Ouratea parviflora* apresentam atividade contra HSV-1 com CE₅₀ de 11.2, 25.8µg/mL, respectivamente. Já a atividade contra o HSV-2 apresentou CE₅₀ de 2.8 e 1.5µg/mL, respectivamente (ARAÚJO *et al*, 2011).

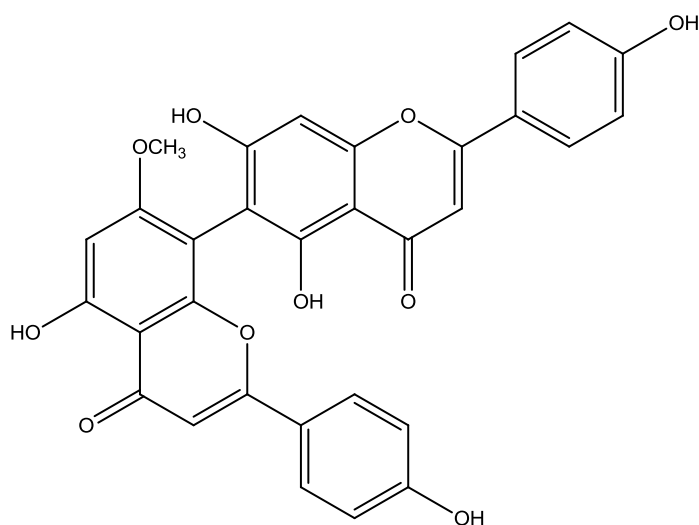
Na literatura são encontradas inúmeras publicações a respeito da descrição das várias atividades biológicas atribuídas aos flavonoides (AHMED *et al*, 2016; DI CARLO *et al*, 1999; NARAYANA *et al*, 2001; SHAFAEI *et al*, 2016), e dentre essas são encontrados estudos comprovando atividades antivirais tanto de flavonoides isolados, como de extratos ou frações enriquecidas nessa classe de metabólito secundário (SANCHÉZ *et al*, 2000; ZANDI *et al*, 2012). Isso torna a classe dos flavonoides uma ferramenta muito promissora nas pesquisas antivirais. Neste sentido, este projeto foi

fundamentado no histórico de atividade antiviral das espécies do gênero *Ouratea*, em especial à classe dos flavonoides.

Figura 4 – Estrutura molecular dos flavonoides Agathisflavona e 7"-metil-agathisflavona (Adaptado de SANCHEZ *et al*, 2000; VRIJSEN *et al*, 1988)



Agathisflavona



7"-metil-agathisflavona

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterização fitoquímica de espécies do gênero *Ouratea* e avaliação *in vitro* da atividade antizika de seus extratos pelo método colorimétrico do MTT.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos extratos etanólicos das espécies *O. castaneifolia*, *O. spectabilis* e *O. semiserrata*;
- Identificação dos constituintes fenólicos presentes nos extratos vegetais e suas frações por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-FR-DAD-EM) e cromatografia em camada delgada (CCD);
- Avaliação da viabilidade celular *in vitro* em linhagem celular Vero pelo método colorimétrico do MTT;
- Avaliação *in vitro* da atividade antizika dos extratos etanólicos de *O. semiserrata*, *O. spectabilis* e *O. castaneifolia* e suas frações pelo método colorimétrico do MTT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes/Solventes utilizados

DMEM – Alta Glicose	Cultilab Materiais para Cultura de Células LTDA
DMSO	Quimibrás Indústrias Químicas S. A.
MTT	Sigma-Aldrich Brasil LTDA
AcOEt	LabSynth Produtos para Laboratório LTDA
MeOH	LabSynth Produtos para Laboratório LTDA
DCM	LabSynth Produtos para Laboratório LTDA
CMC	LabSynth Produtos para Laboratório LTDA
Etanol	LabSynth Produtos para Laboratório LTDA
Sílica Gel 60	Merck

4.2 Aparelhos utilizados

Câmara Escura UV	CienLab Equipamentos Científicos (Modelo CE-850)
Fluxo BioSeg12	Grupo VECO (Classe II, Tipo A1)
Rotavapor® R-205	BÜCHI Brasil LTDA
Estufa de Células	Binder GmbH
Victor X3	PerkinElmer do Brasil LTDA
Shaker	Marshal Scientific (New Brunswick Scientific C24)
Microscópio Invertido	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Centrífuga Microcen®16	Herolab GmbH

4.3 Coleta do material vegetal

As plantas foram coletadas nos municípios de Belo Horizonte e Caeté (Minas Gerais), as exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Tabela 1). O material vegetal colhido foi seco em estufa ventilada a 40°C. Após a secagem, o material foi pulverizado em um moinho de facas. O pó vegetal resultante foi acondicionado em frasco de vidro.

Tabela 1: Registros de exsicata de espécies do gênero *Ouratea*

ESPÉCIE	REGISTRO EXSICATA	PARTE UTILIZADA
<i>Ouratea castaneifolia</i>	BHCB 25577	Folhas
<i>Ouratea semiserrata</i>	BHCB 42166	Caule
<i>Ouratea spectabilis</i>	BHCB 48940	Folhas

4.4 Preparo dos extratos

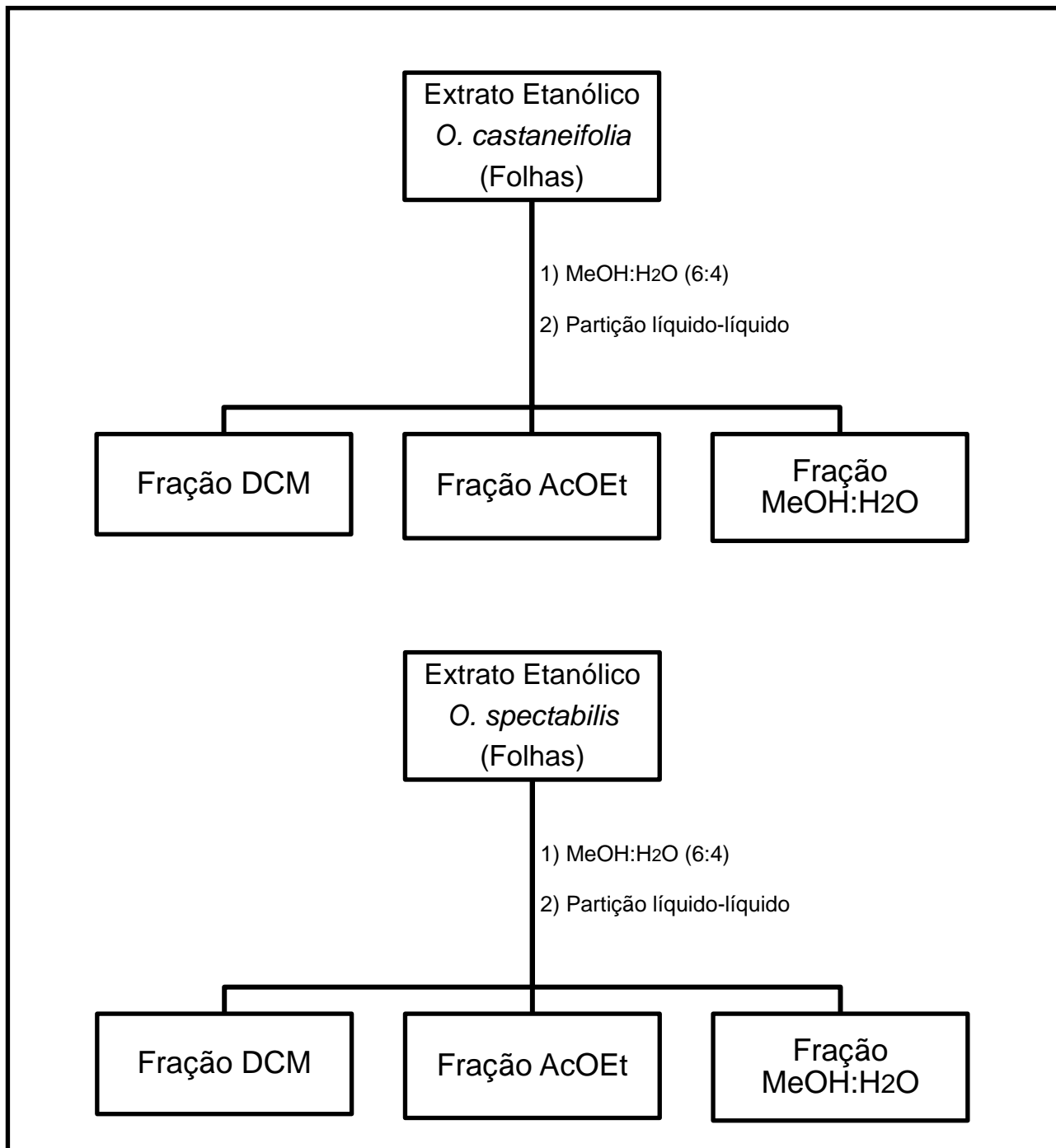
As folhas de *Ouratea castaneifolia*, folhas de *Ouratea spectabilis* e caule de *Ouratea semiserrata* foram submetidos a extrações exaustivas com etanol 92,8° GL através de percolação à frio. Os extratos foram concentrados utilizando evaporador rotativo à vácuo, e posteriormente, deixados em estufa com temperatura controlada de 50°C para a completa evaporação do solvente.

4.5 Partição dos extratos etanólicos brutos de *O. castaneifolia* e *O. spectabilis*

Com os extratos etanólicos das folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* foi feita uma partição líquido-líquido utilizando diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e mistura de metanol e água (MeOH/H₂O) na proporção 6:4 como solventes, para obtenção de frações com diferentes perfis de polaridade. Inicialmente, cada material vegetal foi misturado em uma solução metanol/água (6:4) e transferido para o funil de separação, onde foram particionados com os solventes orgânicos como mostrado na figura

5. O processo de partição líquido-líquido foi feito somente com *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis*, pois foram os dois extratos destas espécies que apresentaram maior concentração de flavonoides em análise por CCD.

Figura 5: Esquema da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas de *O. castaneifolia* e *O. spectabilis*. (DCM – Diclorometano; AcOEt – Acetato de Etila; MeOH – Metanol)



4.6 Análise fitoquímica dos extratos etanólicos brutos das espécies *O. castaneifolia* (folhas), *O. spectabilis* (folhas) e *O. semiserrata* (caule) e suas frações

A análise para identificar flavonoides e terpenos nos extratos etanólicos das espécies citadas e em suas frações foi feita utilizando a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) através de cromatoplasmas revestidas de gel de sílica (Merck®), em suporte de vidro com dimensões 10 x 10 cm, com 0,50mm de espessura. Utilizou-se clorofórmio, acetona e ácido fórmico na proporção 75:16,5:8,5 (v/v) como fase móvel. Após a aplicação e o término da eluição da amostra, as placas foram pulverizadas com solução reveladora de reagente cromogênio, o reagente de produto natural-polietilenoglicol (NP-PEG), seguido de aquecimento com auxílio de soprador térmico, para a detecção de flavonoides. Os flavonoides são detectados pelo surgimento de coloração amarela após pulverização e secagem da cromatoplasma. A revelação dos metabólitos analisados nas cromatoplasmas foi obtida através da exposição destas à radiação ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254nm e 365nm, em câmara escura de luz ultravioleta antes e após aplicações do revelador.

O revelador NP foi preparado solubilizando 100mg de ácido difenilbórico/ester etanolamina 98% em 10mL de etanol. O revelador PEG foi preparado utilizando 40mg de polietilenoglicol em 8mL de etanol.

4.7 Obtenção de perfis cromatográficos por CLUE-FR-DAD-EM

Perfis cromatográficos foram obtidos por meio de cromatografia líquida de ultra eficiência em fase reversa (CLUE-FR) para os três extratos etanólicos selecionados para este trabalho, e também para as frações obtidas por partição líquido-líquido da *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* e das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de *Ouratea castaneifolia*. As análises por CLUE-FR foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais nas condições descritas a seguir.

Utilizou-se o equipamento UPLC ACQUITY (Waters®), acoplado ao detector DAD (detector de arranjo de diodos) – varredura de 220-400 nm e

detector de espectrometria de massas, coluna CSH130 C18 (partículas de 1,7 μm , 50 x 3 mm d.i.), fluxo de 0,3 mL/min e manteve-se o forno da coluna a 40°C. Empregou-se um gradiente de água (H_2O) 0,1% ácido fórmico – acetonitrila (MeCN) 0,1% ácido fórmico (Tabela 2), compreendendo um período de eluição gradiente linear longo (5 – 95% de MeCN, em 10 minutos), mantendo-se, a seguir, um curto período de eluição isocrática (95% de MeCN, durante 1 minuto). Os solventes utilizados eram grau HPLC (Tedia Brasil®) e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q®.

Na obtenção dos espectros de massa, empregou-se sistema *Electrospray ionization* (ESI), temperatura capilar 250°C, voltagem no pulverizador ajustada em 3,50 kV, voltagem do capilar +3 e -47 V, para as polaridades positiva e negativa, e deslocamento da lente do tubo de 0 e -25 V, para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Utilizou-se nitrogênio como um gás de fundo com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. A análise de massa foi realizada em modo de varredura total de 100 a 1.500 Da, tanto no modo positivo como no negativo.

Tabela 2 – Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos e frações por CLUE-FR

TEMPO (min)	H ₂ O	MeCN
	0,1% ÁCIDO FÓRMICO	0,1% ÁCIDO FÓRMICO
0	95	5
10	5	95
11	5	95
13	95	5

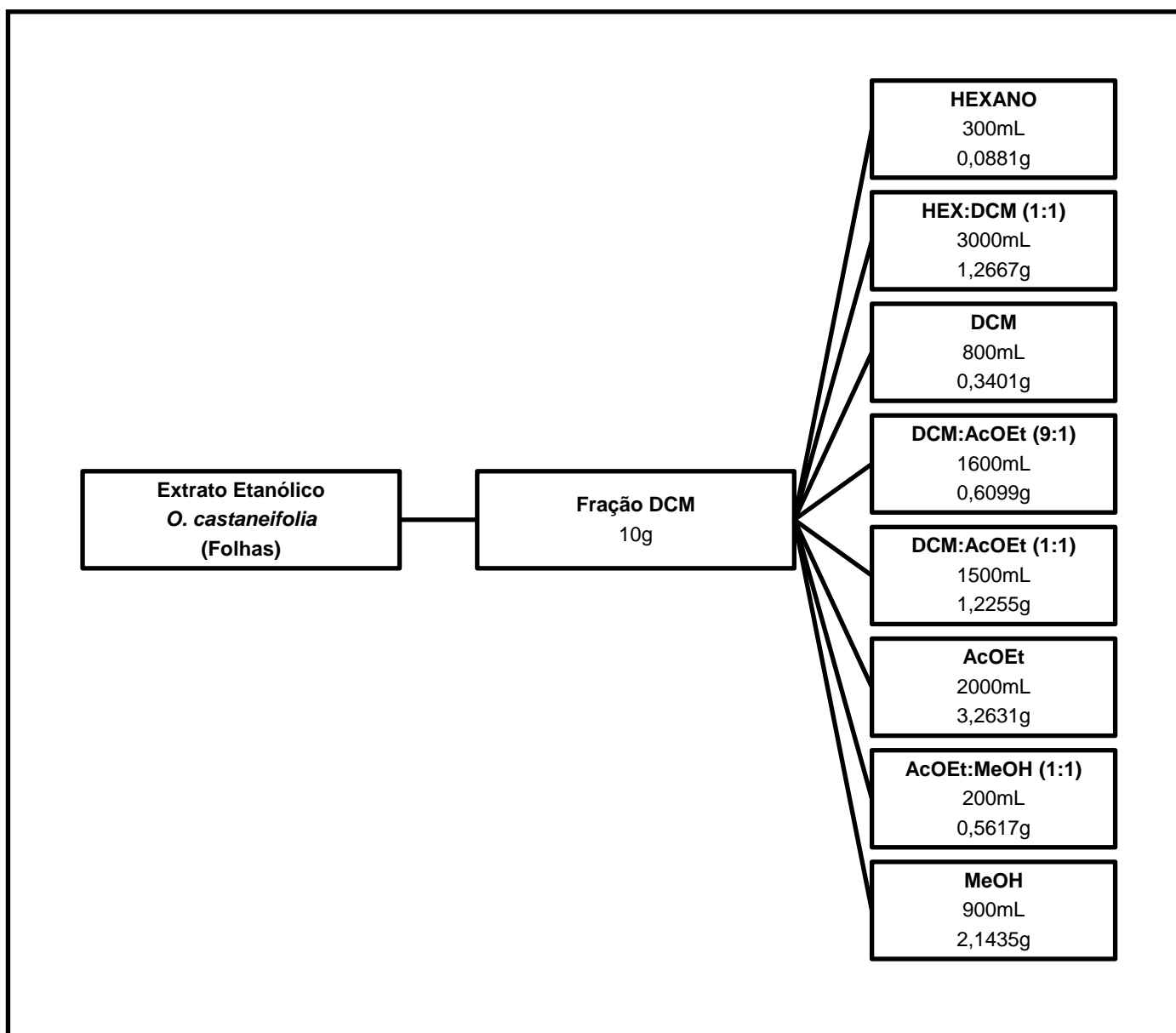
4.8 Refracionamento da fração diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Ouratea castaneifolia* por cromatografia em coluna de sílica gel.

Após a partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* (item 4.5), realizou-se análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas de ambas as partições. Após a análise, verificou-se que a fração diclorometano da *Ouratea castaneifolia* apresentou maior quantidade de flavonoides em sua composição. Portanto, esta fração foi escolhida para ser refracionada na tentativa de obter

um flavonoide isolado ou uma fração enriquecida com flavonoides. Realizou-se então cromatografia em coluna com sílica gel. No empacotamento da coluna empregou-se 100g de sílica gel (0,040-0,063 mm/230-400 mesh, Merck®) como fase estacionária. Utilizou-se 10g da amostra em sílica gel e a eluição foi realizada empregando solventes de polaridade crescente conforme mostrado na Figura 6. Foram coletadas no total 108 frações de aproximadamente 100mL que foram concentradas utilizando evaporador rotativo à vácuo e colocadas na estufa a 50°C para completa evaporação do solvente.

Após total secagem, as frações foram submetidas a análises por cromatografia em camada delgada. As que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, resultando em 42 frações, totalizando 9,5g.

Figura 6: Esquema do refração da fração DCM da espécie *O. castaneifolia*



4.9 Ensaios *in vitro* para atividade citotóxica e antiviral

4.9.1 Linhagens celulares

✓ C6/36

Células C6/36 são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*, cultivadas em meio L15 suplementado com 5% SFB contendo gentamicina (50 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B a (5 µg/mL), em estufa a 28°C. Estas células foram utilizadas para a produção de estoque viral de ZIKV.

✓ Vero (ATCC® CCL-81™)

Células Vero são derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) cultivadas em meio DMEM – alta glicose suplementado com 5% SFB contendo gentamicina (50 µg/ml), penicilina (100 UI/ml) e anfotericina B (5 µg/ml), em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Estas células foram utilizadas para o ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral pelo método colorimétrico do MTT. Utilizou-se uma concentração de plaqueamento de 2,0 x 10⁴ células por poço.

4.9.2 Soluções e meios de cultura

A solução salina-fosfato tamponada (PBS) foi preparada como solução estoque concentrada 5 vezes. Esta solução concentrada tem em sua constituição: NaCl 680mM, KCl 13,4 mM, Na₂HPO₄ 40,5mM (pH 7,5). A solução foi esterilizada em autoclave (120°C, 45 minutos) e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultra pura estéril, recém-obtida.

O meio de cultura utilizado foi o DMEM – alta glicose, que é uma modificação do Meio Basal Eagle (BME) que contém quatro vezes a concentração de aminoácidos e vitaminas. O meio é reconstituído em água ultra pura e esterilizado em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore) sob pressão. Após o procedimento de filtração, alíquotas do meio foram deixadas em estufa a 37°C, para o acompanhamento de eventuais contaminantes. O meio foi mantido em geladeira a 4°C. Para os experimentos, o meio foi suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino

estéril inativado. O pH do meio foi ajustado com quantidades adequadas de solução de bicarbonato de sódio para pH 7,4 e então esterilizado em autoclave a 120°C por 45 minutos.

Também utilizou-se meio DMEM – alta glicose 2% CMC (carboximetilcelulose) para titulação em placa de seis poços. Inicialmente acrescentou-se 8g de CMC esterilizado em 400mL de meio DMEM – alta glicose suplementado com 1% (v/v) de soro fetal bovino e os antibióticos gentamicina (50µg/mL), penicilina (100UI/mL) e anfotericina (5µg/mL) em frasco de vidro. Posteriormente deixou o frasco agitando até completa solubilização do CMC no meio de cultura. O meio foi mantido em geladeira a 4°C.

A solução de tripsina-EDTA é constituída de NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, glicose 5 mM, Na₂HPO₄ 0,42 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, NaHCO₃ 2,3 mM, EDTA 0,53 mM, 50 mg% tripsina (1:250) e 2 mg% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. Esterilizou-se a solução por filtração e armazenou-se a -20°C.

4.9.3 Procedimento de cultivo das linhagens celulares Vero e C6/36

As células Vero foram cultivadas em garrafas estéreis com meio DMEM - alta glicose e as células C6/36 em meio L-15, ambos os meios acrescidos de soro fetal bovino 5% (v/v) e Penicilina, Streptomocina e Anfotericina B conforme item 4.9.2. As culturas da linhagem Vero foram mantidas em estufa, em atmosfera contendo 5% de CO₂, com umidade controlada de 95% e temperatura constante de 37°C. Já a linhagem celular C6/36 foi mantida em estufa a 28°C. Os repiques foram realizados utilizando solução de tripsina-EDTA para soltar as células em intervalos de 48h na proporção de 1:3. Para armazenamento das linhagens, as células (10⁶ células/mL) foram suspensas em meio de cultura e DMSO 10% (v/v), e congeladas inicialmente a -70°C e mantidas durante 48 horas, e a seguir estocadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para uso, as células foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas pequenas (50 mL) contendo meio adequado como já descrito. Após adesão das células à superfície da garrafa (~2horas), o meio foi trocado, eliminando-se o meio de congelamento contendo o DMSO e eventuais células

mortas. A monocamada de células foi rotineiramente observada em microscópio invertido.

4.9.4 Técnica colorimétrica do MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

As suspensões celulares foram distribuídas em microplacas de 96 cavidades contendo aproximadamente $2,0 \times 10^4$ células/cavidade. As culturas foram incubadas em atmosfera úmida, a 5% de CO₂, a 37°C. Foram preparadas diluições dos extratos/frações, em DMEM 1% SFB (Soro Fetal Bovino), em concentrações que variaram entre 400 e 1,562 µg/ml. Após a formação da monocamada celular na superfície das cavidades, o meio de cultura foi removido e 100 µL das soluções diluídas das substâncias testes/extratos e 100 µl de meio de cultura DMEM – Alta Glicose 1% SFB foram adicionados. O MTT foi adicionado 2 horas antes das leituras (MOSMANN, 1983), que foram feitas em leitor de microplacas, a 490 nm, 72 horas após a adição do extrato/fração. Utilizou-se a podofilotoxina como controle positivo de citotoxicidade.

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

Realizou-se teste de citotoxicidade com os três extratos etanólicos selecionados para este trabalho, e também para as frações obtidas por partição líquido-líquido da *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* e das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de *Ouratea castaneifolia*

4.9.5 Análise estatística dos dados

Os dados dos ensaios de citotoxicidade foram avaliados segundo suas médias e desvios-padrão. A concentração citotóxica a 50% foi determinada em comparação com o controle, obtidos a partir de regressão não-linear. Estas

análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico do *GraphPad Prism* 5.04.

4.9.6 Vírus

O ZIKV utilizado nos experimentos foi gentilmente cedido pela professora Dr. Erna Kroon, do Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.9.7 Preparo da suspensão viral

Para a produção de estoque de ZIKV para os ensaios antivirais, o ZIKV foi replicado em cultura de células C6/36 (Item 4.9.1) durante cinco dias à temperatura de 28°C. Recolheu-se o sobrenadante da cultura de células infectadas pelo ZIKV cinco dias após a infecção. O sobrenadante recolhido foi clarificado por centrifugação a 4.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foi aliquoteado e armazenado em freezer a -70°C para posterior utilização.

As linhagens celulares C6/36 e Vero foram escolhidas para multiplicação e titulação celular, respectivamente. A C6/36 é caracterizada por possuir bons rendimentos frente ao ZIKV, permitindo assim a produção de estoque viral com alto rendimento. A Vero foi escolhida também para o ensaio antiviral com ZIKV por possuir uma alta permissividade a esse vírus.

4.9.8 Titulação viral em placa de 6 poços

Inicialmente, a partir do estoque viral, realizaram-se diluições de 10^{-1} a 10^{-10} e foram inoculadas 300µL de cada diluição viral em monocamada de células Vero em placa de seis poços com confluência de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células. Em cada poço inoculou-se a diluição viral correspondente e um poço foi mantido somente com células para o controle celular. Em seguida, a placa foi mantida na estufa a 37°C e 5% CO₂ durante 1 hora para a adsorção e, esperado este tempo, lavou-se os poços com solução PBS para remover os vírus que não adsorveram. Após a lavagem, adicionou-se aos poços 3mL de meio DMEM – Alta Glicose 2% CMC suplementado com 1% (v/v) de SFB (Item 4.9.2). As placas foram então incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 72

horas. Após este tempo, as células foram fixadas com solução de formol 10% por 4h e coradas com solução contendo 1% (p/v) de cristal violeta em água destilada para contagem das placas de lise. O título viral foi expresso por número de Unidade Formadora de Placas por mililitros (UFP/mL) conforme equação seguinte:

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

N = número de placas de lise contadas

FC = Fator de correção

* = Inverso da diluição na qual foram contadas as placas de lise

O título viral encontrado na solução estoque foi $3,1 \times 10^9$ UFP/mL

4.9.9 Titulação em placa de 96 poços

Inicialmente, preparou-se placas de 96 poços contendo $2,0 \times 10^4$ células Vero por poço, em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 durante 24 horas para a formação de monocamada de células. Prepararam-se suspensões virais com diluições de 10^{-1} a 10^{-27} em meio DMEM – Alta Glicose suplementado com 1% (v/v) de SFB e inoculou-se 100 μL de cada diluição e cada poço correspondente com monocamada de células Vero, mantendo três colunas de poços não infectados para controle celular. As placas infectadas foram incubadas em estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente, por 72 horas, observando-se o controle de células. Observou-se então a coluna correspondente à diluição viral que apresentou efeito citopático em 50% das células. A diluição observada foi de 10^{-6} . No ensaio antiviral utilizou-se uma diluição de 10^{-4} onde observou-se 100% de efeito citopático.

4.9.10 Ensaio de atividade antiviral pelo método colorimétrico do MTT

Prepararam-se soluções em DMSO das amostras que foram analisadas utilizando concentrações não citotóxicas.

As monocamadas de células Vero foram preparadas em placa de 96 poços contendo $2,0 \times 10^4$ células por poço em meio de cultura DMEM – Alta Glicose suplementado com 5% de SFB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, removeu-se o meio de cultura da placa e acrescentou-se 100µL das diluições das amostras e adicionou-se 100µL de suspensão viral. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa, nas mesmas condições descritas anteriormente, durante 72 horas. A viabilidade celular foi analisada utilizando a técnica colorimétrica do MTT descrita por Mosmann em 1983. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 28µL de solução de MTT em PBS (2,0 mg/mL) por poço. A placa foi incubada em estufa durante 2 horas a 37°C. Decorrido este tempo, acrescentou-se aos poços 132,0µL de DMSO para dissolver os cristais de formazana. As placas foram homogeneizadas durante 15 minutos utilizando um agitador (Shaker New Brunswick Scientific C24) e a densidade ótica foi determinada em 490nm (DO₄₉₀) em leitor de microplacas Victor™ X3. A partir dos valores de densidade ótica calculou-se então a porcentagem do efeito protetor contra o ZIKV conferida às células para cada concentração de amostra, utilizando a seguinte equação:

$$EP = [(A - B) / (C - B)] \times 100$$

Onde:

A: Leitura da absorbância dos poços com células tratadas e infectadas

B: Leitura da absorbância dos poços com células não tratadas e infectadas

C: Leitura da absorbância dos poços com células não tratadas e não infectadas

Com os valores do efeito protetor calculado para cada concentração, calculou-se, através de regressão não-linear, a Concentração Efetiva a 50% (CE₅₀), que demonstra em que concentração o composto testado protege 50% das células contra a ação do ZIKV. Calculou-se os valores de CE₅₀ para os três extratos etanólicos selecionados para este trabalho, e também para as frações obtidas por partição líquido-líquido da *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* e das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de *Ouratea castaneifolia*.

Para a realização deste experimento, foram utilizados os seguintes controles:

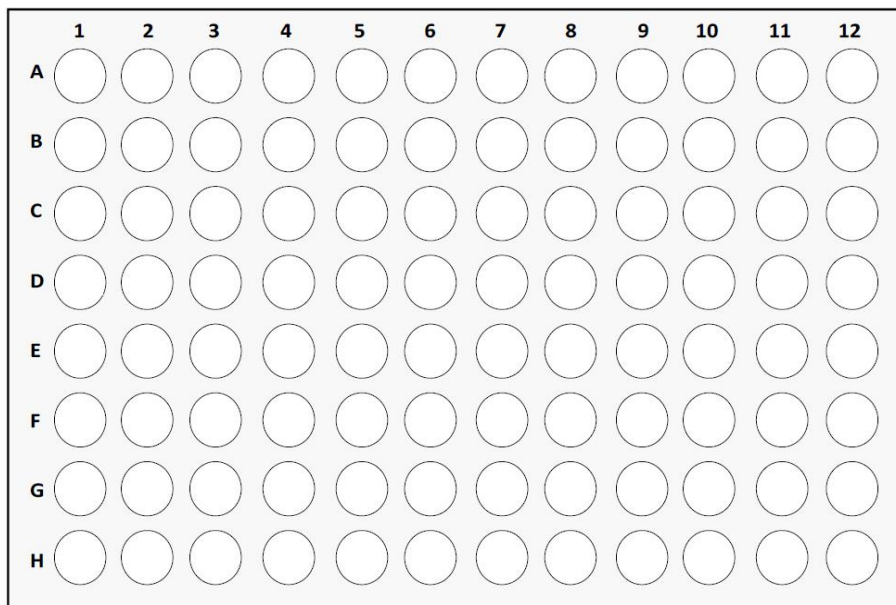
Controle de células: poços contendo somente células, acrescidas do meio de cultura DMEM – Alta Glicose 1% SFB. Utilizado para avaliar o comportamento das células sem que as mesmas tivessem contato com qualquer interferente durante o período de incubação. Com isso, os poços reservados para esse controle serviram de padrão para comparação com aqueles em que fossem observados alguma atividade citotóxica.

Controle de vírus: poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM – Alta Glicose 1% SFB e de suspensão de vírus sem nenhum tratamento. Utilizando como referência para análise da atividade citopática provocada pelo vírus durante o período de incubação das placas.

Controle de vírus com DMSO: Poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM – Alta Glicose 1% SFB e DMSO. Foi utilizado para avaliar se havia influência do solvente utilizado para diluição das amostras no meio de cultivo e se o mesmo poderia apresentar alguma potencial atividade antiviral aparente.

Controle de Citotoxicidade dos compostos utilizados: Poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM – Alta Glicose 1% SFB e as diluições das concentrações em que os respectivos compostos foram utilizados. Este controle foi feito para avaliar se haveria alguma possível atividade citotóxica das substâncias nas concentrações testadas. Um desenho representativo do teste antiviral na placa de 96 poços é mostrado na Figura 7 a seguir:

Figura 7 – Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada para atividade antiviral frente ao ZIKV pelo método colorimétrico do MTT (Colunas 1 e 2: Controle de células; Coluna 3: Controle de Vírus com DMSO; Coluna 4: Controle de citotoxicidade do composto 1; Colunas 5, 6 e 7: Avaliação antiviral do composto 1; Colunas 8, 9 e 10: Avaliação antiviral do composto 2; Coluna 11: Controle de citotoxicidade do composto 2; Coluna 12: Controle de vírus)



4.9.11 Ensaio de atividade antiviral pelo método colorimétrico do MTT em placa de 6 poços

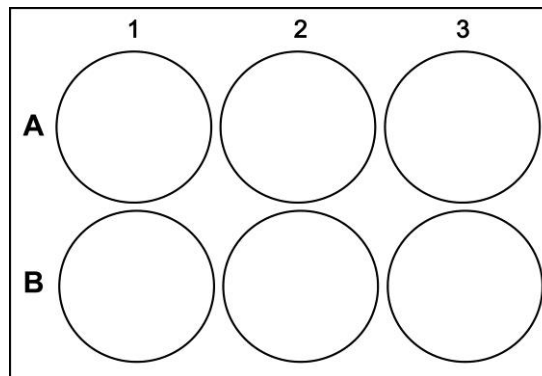
Após a avaliação da atividade antiviral pelo método colorimétrico do MTT, selecionaram-se os compostos (extrato/fração) que em determinada concentração apresentaram um efeito protetor satisfatório às células contra o efeito citopático do ZIKV. Realizou-se um ensaio antiviral em placa de 6 poços para fotografar, por microscopia óptica, e confirmar o efeito protetor do composto na concentração selecionada.

Inicialmente, preparou-se placas de 6 poços contendo $4,0 \times 10^5$ células Vero por poço e, em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 durante 24 horas para a formação de monocamada de células. Após 24h, acrescentou-se $300\mu\text{L}$ de suspensão viral em quatro poços, sendo um para controle viral e três para o teste antiviral. Incubou-se por uma hora em estufa nas mesmas condições descritas anteriormente com agitação de dez em dez minutos para melhor adsorção.

Após uma hora de adsorção, acrescentou-se o composto na concentração específica em 3 poços para o teste em triplicata e em um poço que não houve adsorção viral para controle do composto.

Após 72 horas as placas foram fotografadas por microscopia óptica para confirmar o efeito protetor. Um desenho representativo da placa está representado a seguir na Figura 8.

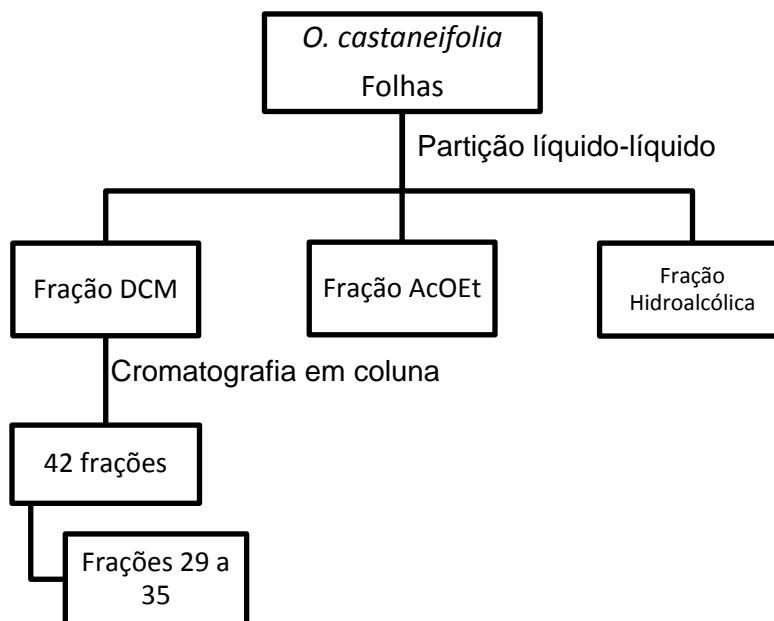
Figura 8 – Representação esquemática da placa de 6 poços utilizada para ensaio antiviral para confirmação de efeito protetor por fotografia por microscopia óptica (A1: Controle de células; A2: Controle de vírus; A3: Controle do composto; B1, B2 e B3: Células infectadas com ZIKV e tratadas com composto)



4.9.12 Resumo metodologia

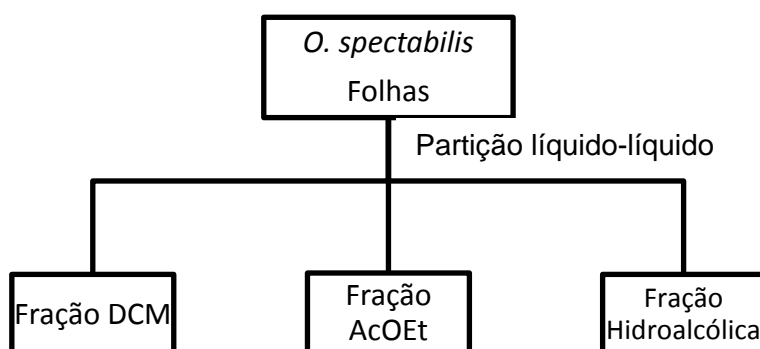
As figuras 9 e 10 a seguir, apresentam um fluxograma resumido da metodologia e dos ensaios realizados com os extratos das espécies de plantas utilizadas no presente trabalho.

Figura 9 – Fluxograma resumindo as etapas realizadas com o extrato etanólico de *Ouratea castaneifolia* para a obtenção de frações enriquecidas com flavonoides



Após obtenção do extrato etanólico das folhas de *Ouratea castaneifolia* por percolação e obtenção das frações por partição líquido-líquido e cromatografia em coluna com sílica gel, realizou-se com todas as etapas, análise cromatográfica por CLUE-FR-DAD-EM e ensaio de citotoxicidade e antiviral contra o ZIKV.

Figura 10 – Fluxograma resumindo as etapas realizadas com o extrato etanólico de *Ouratea spectabilis* para a obtenção de frações enriquecidas com flavonoides



Após obtenção do extrato etanólico das folhas de *Ouratea spectabilis* por percolação e obtenção das frações por partição líquido-líquido, realizou-se com todas as etapas, análise cromatográfica por CLUE-FR-DAD-EM e ensaio de citotoxicidade e antiviral contra o ZIKV.

Não foi feita partição líquido-líquido do extrato etanólico do caule de *Ouratea semiserrata*, portanto, realizou-se análise cromatográfica por CLUE-FR-DAD-EM e ensaio de citotoxicidade e antiviral contra o ZIKV apenas com o extrato etanólico.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos extratos etanólicos das espécies *Ouratea castaneifolia*, *Ouratea spectabilis* e *Ouratea semiserrata*.

Os rendimentos extrativos das espécies vegetais estão apresentados abaixo na tabela 3.

Tabela 3: Rendimento extrativo do material vegetal de espécies do gênero *Ouratea*

ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	MASSA DO MATERIAL VEGETAL(g)	MASSA DO EXTRATO (g)	RENDIMENTO (%)
<i>O. castaneifolia</i>	Folhas	169,5	39,0	23
<i>O. castaneifolia</i>	Caule	184,2	17,5	9,5
<i>O. spectabilis</i>	Folhas	166,6	40,0	24
<i>O. semiserrata</i>	Caule	836,6	133,8	16

Na tabela 4 estão apresentados os rendimentos da partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas de *Ouratea castaneifolia* e *O. spectabilis*.

Tabela 4: Rendimentos das frações obtidas da partição líquido-líquido de espécies do gênero *Ouratea*.

ESPÉCIE	DCM	AcOEt	H ₂ O/MeOH
	MASSA(g) / RENDIMENTO(%)	MASSA(g) / RENDIMENTO(%)	MASSA(g) / RENDIMENTO(%)
<i>O. castaneifolia</i> - Folhas (38g)	10,9 / 28,6	4,9 / 12,8	22,3 / 58,6
<i>O. spectabilis</i> - Folhas (38g)	4,4 / 11,5	8,8 / 23,1	24,6 / 64,7

5.2 Refracionamento da fração diclorometano de folhas de *Ouratea castaneifolia* por Cromatografia em coluna de sílica gel

As análises por cromatografia em camada delgada realizada com a fração diclorometano de folhas de *Ouratea castaneifolia* demonstraram elevada concentração de flavonoides. Realizou-se, então, cromatografia em coluna com sílica gel (Tabela 5) tendo como objetivo obter frações enriquecidas destes compostos. Este fracionamento também foi monitorado por CCD. As frações 29 a 35 apresentaram uma maior concentração de flavonoides e portanto, foram as frações-alvo deste estudo para o ensaio antiviral.

Tabela 5: Frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de folhas de *Ouratea castaneifolia*

FRAÇÃO	SOLVENTE	PESO(g)
01	Hexano	0,0436
02	Hexano	0,0368
03	Hexano	0,0077
4	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0217
5	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0820
6	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,1100
7	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0538
8	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0930
9	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,1234
10	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,2973
11	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0082
12	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0494
13	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0217
14	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0285
15	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0278
16	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0232
17	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,2322
18	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0731
19	Hexano:Diclorometano(1:1)	0,0214

Tabela 5 (continuação)

20	Diclorometano	0,0171
21	Diclorometano	0,0690
22	Diclorometano	0,0544
23	Diclorometano	0,0515
24	Diclorometano	0,0475
25	Diclorometano	0,1006
26	Diclorometano:AcOEt (9:1)	0,2184
27	Diclorometano:AcOEt (9:1)	0,2067
28	Diclorometano:AcOEt (9:1)	0,1848
29	Diclorometano:AcOEt (1:1)	0,6938
30	Diclorometano:AcOEt (1:1)	0,3614
31	Diclorometano:AcOEt (1:1)	0,0731
32	Diclorometano:AcOEt (1:1)	0,0625
33	Diclorometano:AcOEt (1:1)	0,0347
34	Acetato de Etila	0,0930
35	Acetato de Etila	0,1183
36	Acetato de Etila	0,6324
37	Acetato de Etila	1,6957
38	Acetato de Etila	0,7045
39	Acetato de Etila	0,0192
40	AcOEt:Metanol (1:1)	0,0166
41	AcOEt:Metanol (1:1)	0,5451
42	Metanol	2,1435
TOTAL	-	9,4986

5.3 Identificações de constituintes fenólicos nos extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia*, folhas de *Ouratea spectabilis*, caule de *Ouratea semiserrata* e suas frações.

Extratos vegetais primários “brutos” possuem como principal característica a presença de um número bastante elevado de constituintes exigindo o emprego de diferentes técnicas analíticas para a identificação da sua composição química. Dentro deste contexto, no presente trabalho empregou-se a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrômetro de massa e UV para a identificação parcial dos constituintes nos extratos e frações. Atualmente, análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM) são frequentemente utilizadas em fitoquímica para a identificação de substâncias presentes em extratos e frações. O uso de CLUE-EM é uma ferramenta poderosa que apresenta alta seletividade e grande sensibilidade, sendo que o uso simultâneo de CLUE-DAD hifenado a EM fornece importantes informações para a elucidação da estrutura química de uma substância (SUMNER *et al.*, 2003). Análise do perfil metabolômico de diferentes espécies vegetais ajudam no direcionamento de estudos biológicos, possibilitando trabalhos farmacológicos/terapêuticos mais específicos de acordo com o perfil metabólico encontrado além da quantificação dos metabólitos de interesse (MOHANTA, 2013, TUGIZIMANA *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a técnica de CLUE-DAD-ESI/EM foi empregada com o objetivo de identificar metabólitos secundários presentes nos extratos, sem haver, necessariamente, o isolamento destes compostos, uma vez que muitas das frações dos extratos ativos foram obtidas em baixas quantidades, fato que inviabiliza a realização de novos processos de separação. Considerando a não disponibilidade de um banco de dados sobre EM de produtos naturais que pudesse ser utilizado, foram consultados dados da literatura sobre estudos fitoquímicos de diferentes extratos de espécies do gênero *Ouratea*.

Através das técnicas mencionadas, 19 substâncias foram propostas nos extratos etanólicos das espécies estudadas. A identificação dos compostos foi feita a partir de dados da literatura científica de compostos encontrados em

espécies de *Ouratea*. Foi feita uma comparação com moléculas já identificadas em espécies vegetais do gênero *Ouratea* com os dados espectrais obtidos experimentalmente para as espécies *Ouratea castaneifolia*, *Ouratea spectabilis* e *Ouratea semiserrata*. A partir da comparação destes dados e pela análise das fragmentações realizadas por ESI no modo negativo, foi possível sugerir os compostos relatados nos próximos tópicos.

Estudos anteriores mostram que espécies do gênero *Ouratea* são fontes ricas em flavonoides, podendo destacar a abundância em biflavonoides. Entre as 19 substâncias identificadas no trabalho, quatro são flavonas glicosiladas, um flavonol glicosilado e dez são biflavonoides. Também foram detectados quatro proantocianidinas.

A Tabela 6 a seguir, apresenta em quais extratos etanólicos das espécies estudadas foi identificada cada substância sugerida.

Tabela 6: Resumo mostrando em qual espécie vegetal cada composto foi identificado

SUBSTÂNCIA	<i>Ouratea</i>	<i>Ouratea</i>	<i>Ouratea</i>
	<i>castaneifolia</i> Folhas	<i>spectabilis</i> Folhas	<i>semiserrata</i> Caule
Vitexina	X		X
Orientina	X		
Luteolina-7-O-glicuronídeo	X		
luteolina-7-O-rutinosídeo	X		
Rutina	X		X
Lanaraflavona	X	X	X
7,4''-di-O-metil-lanaraflavona	X		
Hinokiflavona	X	X	
Amentoflavona	X	X	
7'',4''-di-O-metil-amentoflavona	X	X	
7,7''-di-O-metil-amentoflavona	X	X	
4',4'',7,7''-tetra-O-metil-amentoflavona	X		
7-O-metilrobustaflavona	X	X	
7,7''-di-O-metilagathisflavona	X		
6,6'' – Bigenkwanina	X		

(epi)-catequina	X
(epi)-catequina-(epi)-catequina	X
(epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)- catequina	X
(epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)- catequina-(epi)-catequina	X

As figuras 11 a 16, a seguir, apresentam os cromatogramas obtidos por CLUE-DAD e EM dos extratos etanólicos das espécies analisadas neste trabalho.

Figura 11: Cromatograma por CLUE-UV do extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*

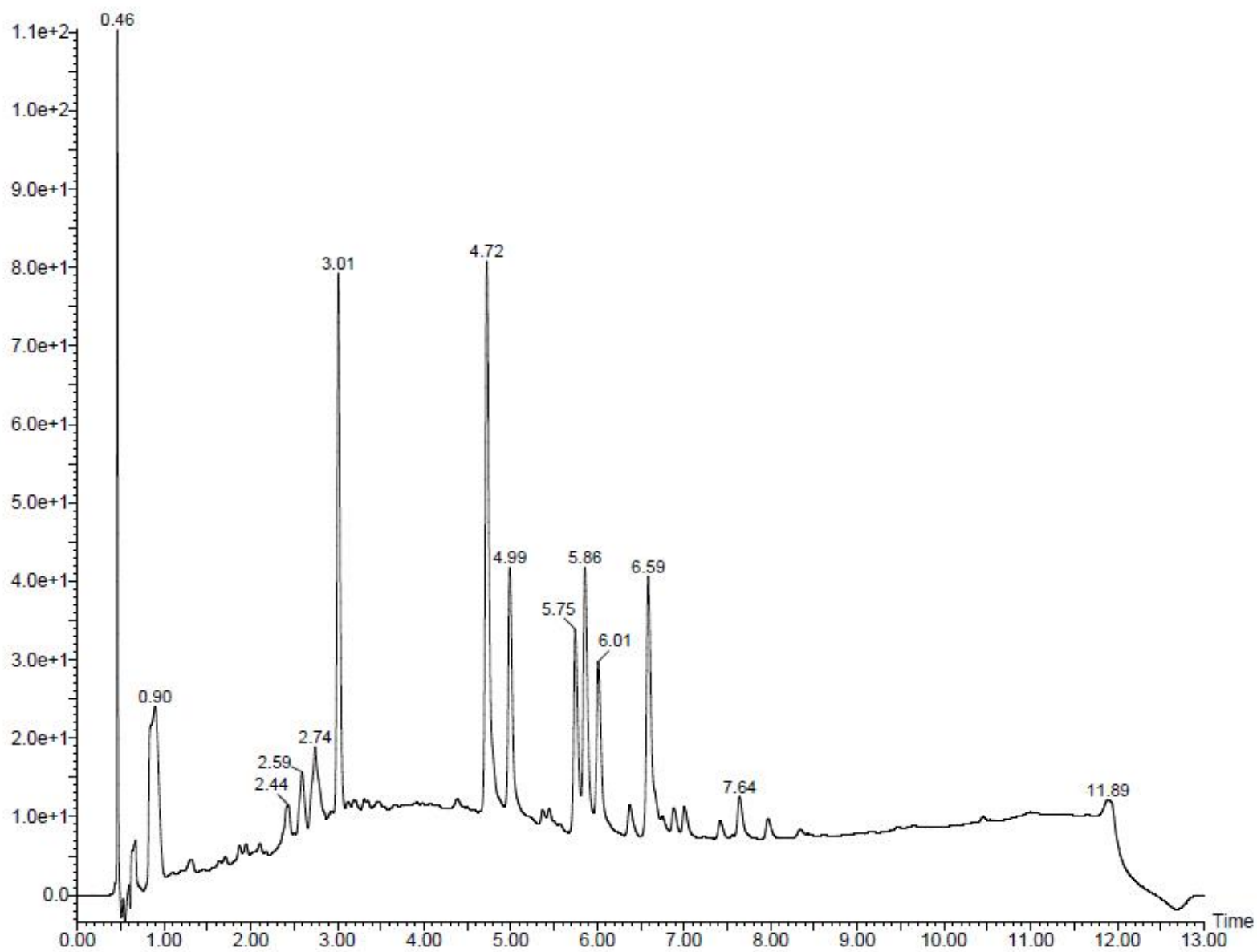


Figura 12: Espectro de massa EM²-ESI⁻ FullScan do extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*

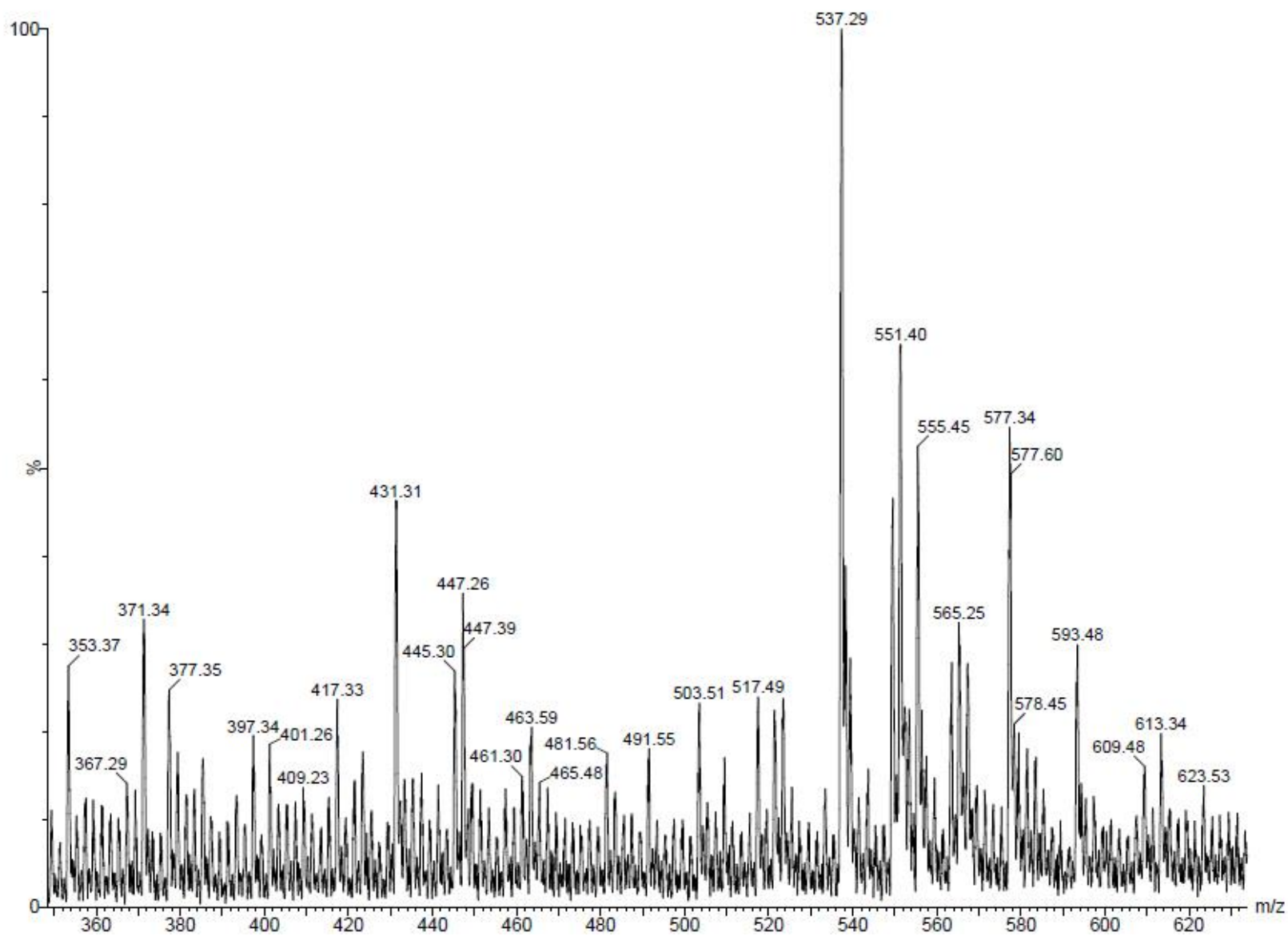


Figura 13: Cromatograma por CLUE-UV do extrato etanólico de folhas de *Ouratea spectabilis*

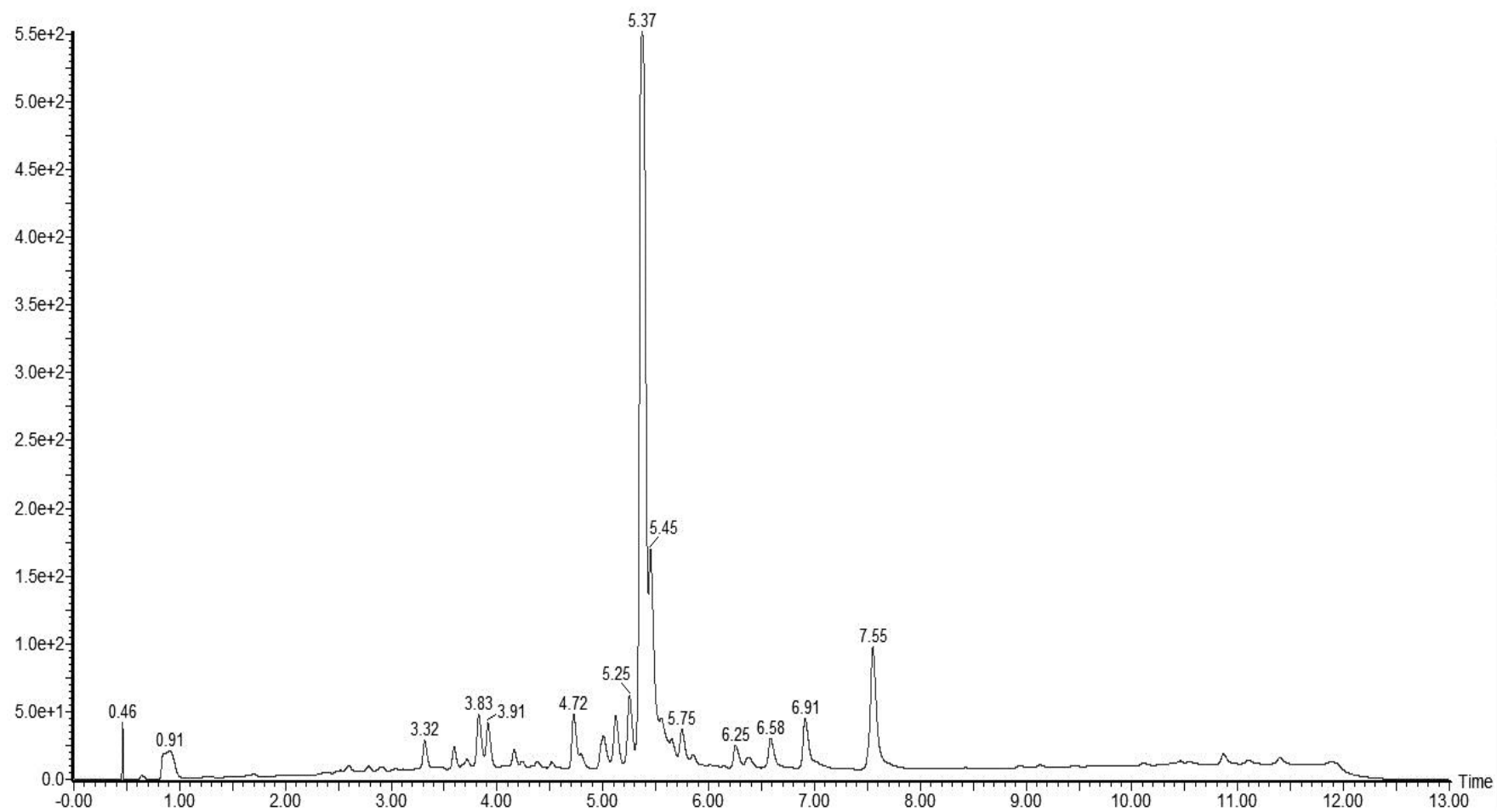


Figura 14: Espectro de massa EM²-ESI⁻ FullScan do extrato etanólico de folhas de *Ouratea spectabilis*

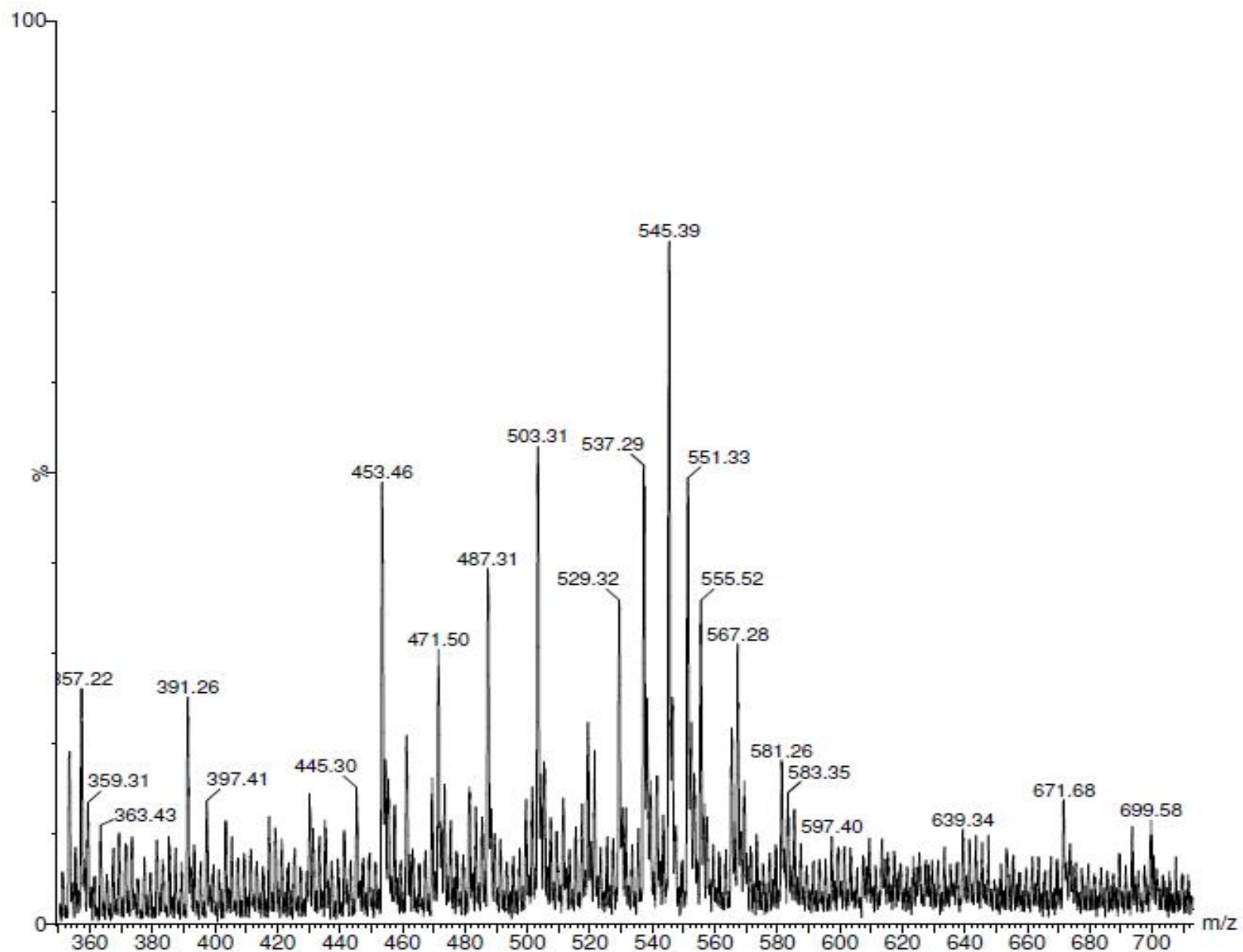


Figura 15: Cromatograma por CLUE-UV do extrato etanólico de caule *Ouratea semiserrata*

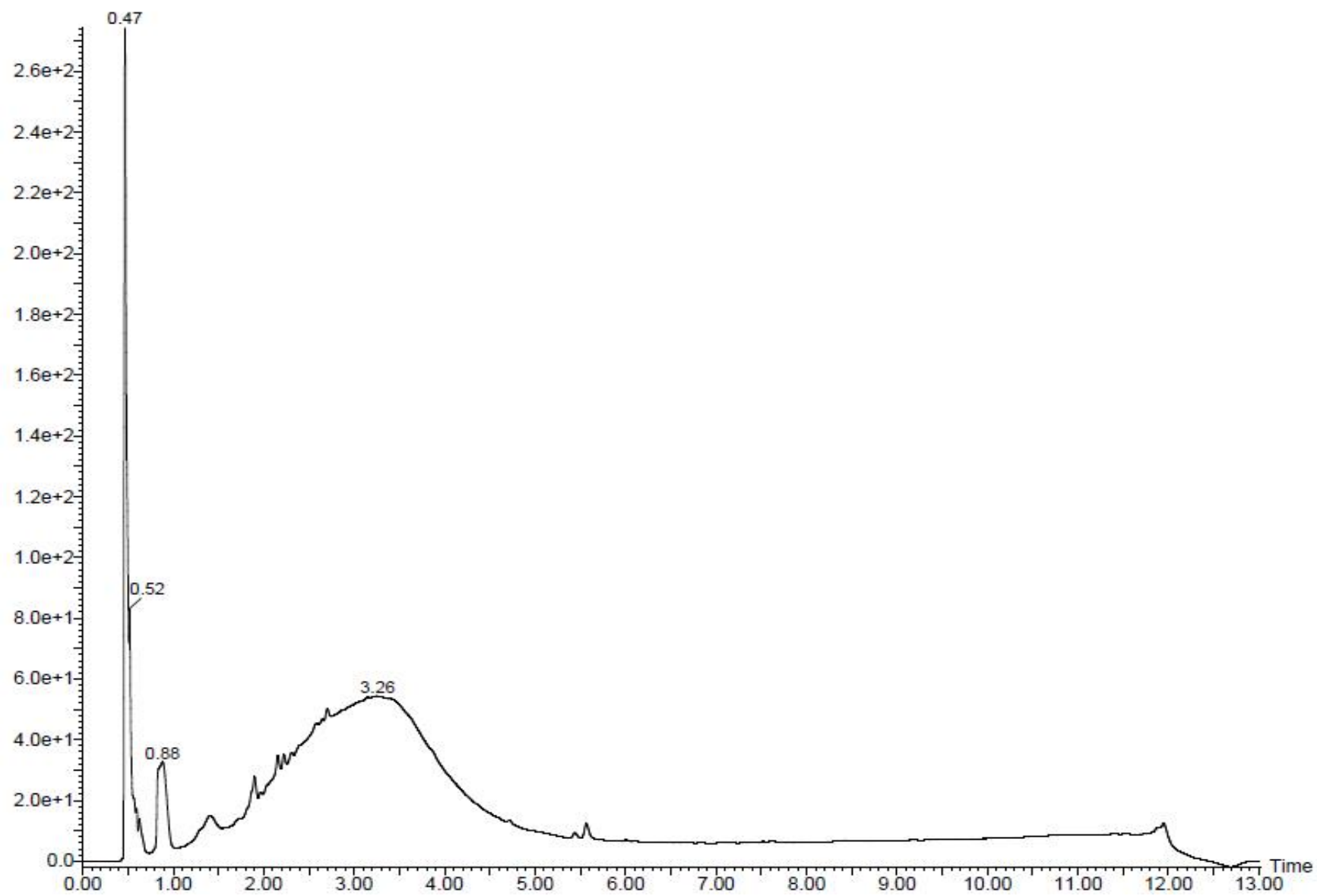
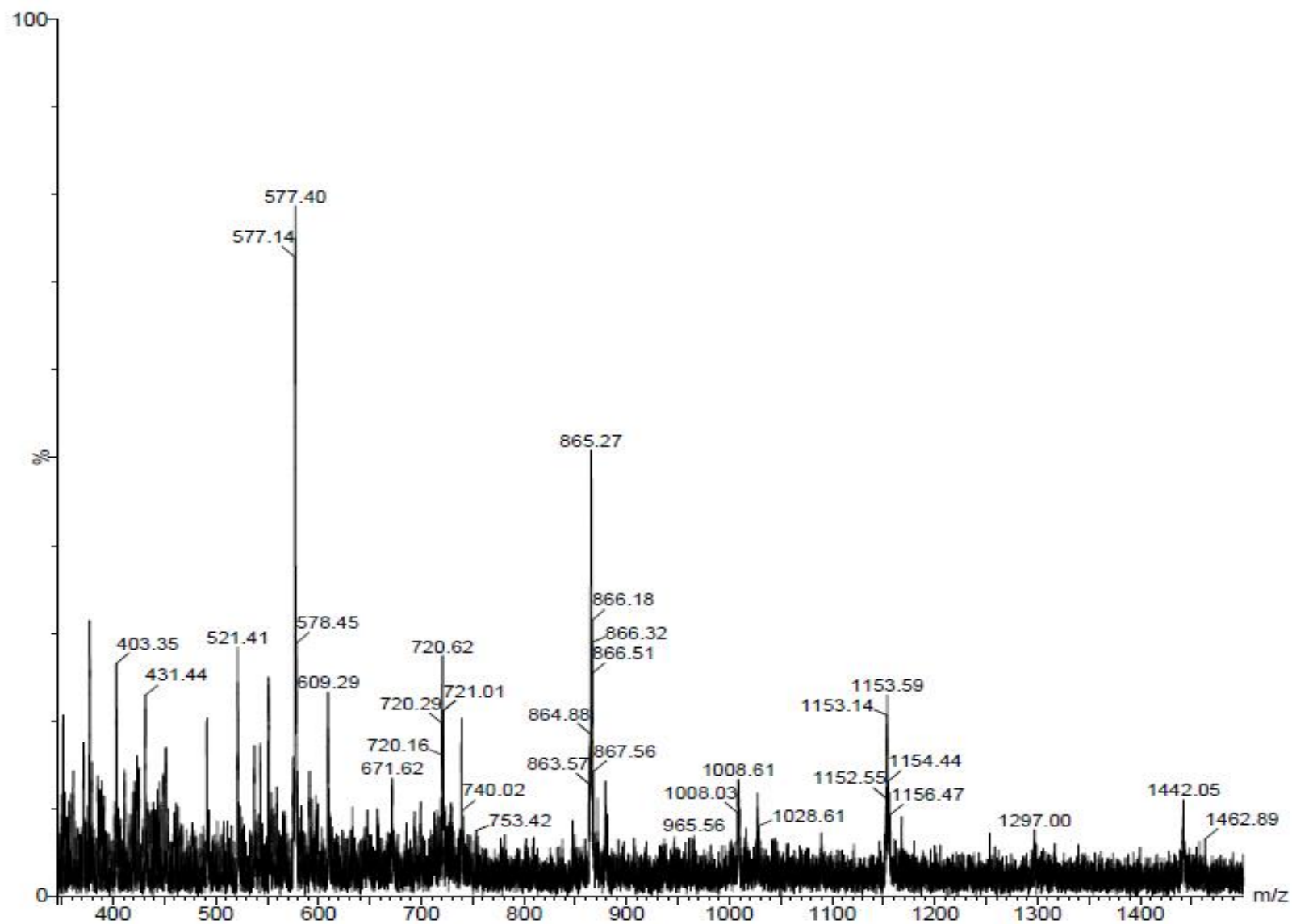


Figura 16: Espectro de massa EM²-ESI⁻ FullScan do extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*



Dados de absorção no UV (λ_{\max}) de diferentes tipos de flavonoides (flavonois λ_{\max} 254/360 nm; flavonas λ_{\max} 254/330 nm; flavanonas λ_{\max} 290 nm) (MABRY *et al.*, 1970), taninos (proantocianidinas λ_{\max} 220/270 nm) (ABAD-GARCÍA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015) foram importantes para a identificação das classes dos produtos naturais possivelmente presentes nas espécies em estudo. Os estudos de fragmentações de constituintes presentes em extratos/frações, importantes para a identificação de produtos naturais, foram realizados por espectrometria de massas sequencial (EM/EM ou EM²), que em inglês é denominada *tandem mass spectrometry* (MSMS ou MS²). Os espectros de massas foram realizados tanto no modo de ionização positivo quanto negativo, dependendo das classes dos compostos em análise. Constatou-se que o modo negativo é mais adequado para compostos fenólicos uma vez que as características ácidas dos mesmos favorecem a perda de um próton levando aos íons [M – H]⁻.

Padrões de fragmentação como perda de açúcares foram observados em O-glicosídeos, como perdas de hexoses levando a íons [M – H - 162]⁻; de ácido glicurônico [M – H - 176]⁻; de ramnose [M – H - 146]⁻; de pentoses [M – H - 132]⁻. Em C-glicosídeos, hexoses levam a íons [M – H - 120]⁻ e [M – H - 90]⁻ enquanto que para pentoses picos são observados em [M – H - 60]⁻, conforme estudos realizados com glicososídeos de flavonoides (HERTOG *et al.*, 1992; COLOMBO *et al.*, 2008).

5.4 Flavonoides

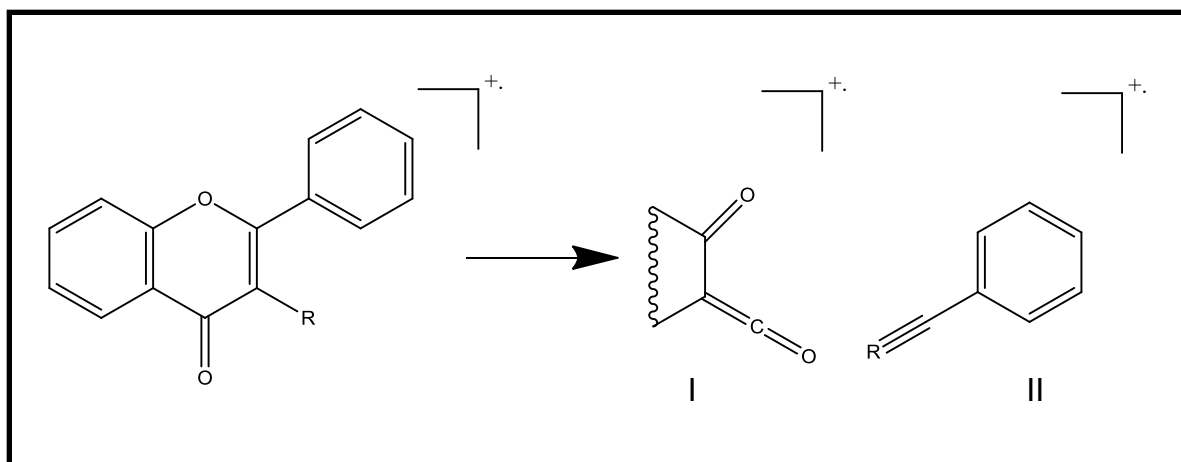
Os flavonoides podem ser identificados e separados por diversas técnicas, onde uma das mais usadas é a CCD, que era utilizada para a separação de compostos fenólicos em geral. Atualmente utilizam-se técnicas mais sofisticadas como CLUE-DAD-EM (ANDERSEN, 2005).

Os flavonoides possuem bandas de absorção no ultravioleta bem características. A banda I, que está relacionada com a absorção do anel B, varia entre 300-380nm. A banda II, relacionada com a absorção do Anel A, varia entre 240-280nm. As flavonas possuem absorção na banda I entre 304-350nm. A intensidade dessa banda aumenta juntamente com o aumento da

oxigenação do anel B (MABRY *et al*, 1970). As biflavonas possuem absorção característico do anel B aproximadamente 330nm (ZHANG *et al*, 2011)

Através da espectrometria de massas pode-se determinar o peso molecular e a distribuição dos substituintes entre os anéis A e B. As flavonas possuem fragmentação notável atribuída à fragmentação do Anel C através da reação retro-Diels-Alder (RDA), gerando dois fragmentos característicos (MARKHAM, 1989), representado na figura 17 pelas estruturas I e II.

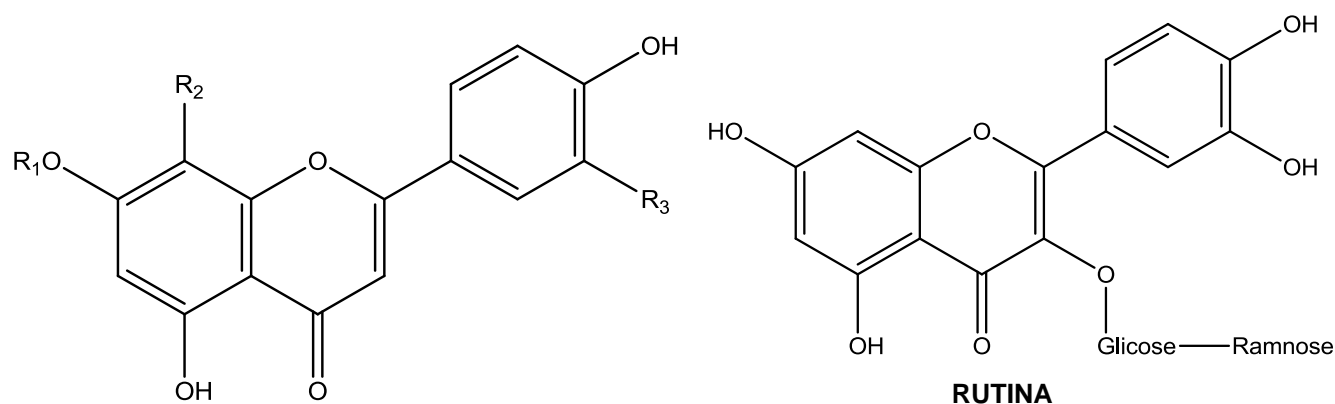
Figura 17: Reação de retro-Diels Alder em flavonoides (MARKHAM, 1989)



5.5 Flavonas e Flavonóis

No extrato etanólico bruto das espécies em estudo, foram identificadas quatro flavonas, onde duas (Vitexina e Orientina) são do tipo C-glicosilflavona, que se caracteriza por ter um grupo glicosídico ligado ao carbono da aglicona. Detectou-se também duas do tipo O-glicosilflavona (Luteolina-O-glicuronídeo e Luteolina-O-rutinosídeo), caracterizada por ter um grupo glicosídico ligado ao grupo hidroxila da aglicona, geralmente localizado na posição 3 ou 7 (DE RIJKE, 2006). As estruturas moleculares das flavonas identificados e seus dados espectrométricos estão descritos nas figuras 18 e 19. Também detectou-se um flavonol (Rutina), que caracterizam-se como um flavonoide que possui uma hidroxila ligada ao terceiro carbono. Neste estudo detectou-se um flavonol glicosilado com cadeia Glicose-Ramnose (Figuras 18 e 19).

Figura 18: Flavonas e flavonol encontrados no extrato etanólico de espécies do gênero *Ouratea*

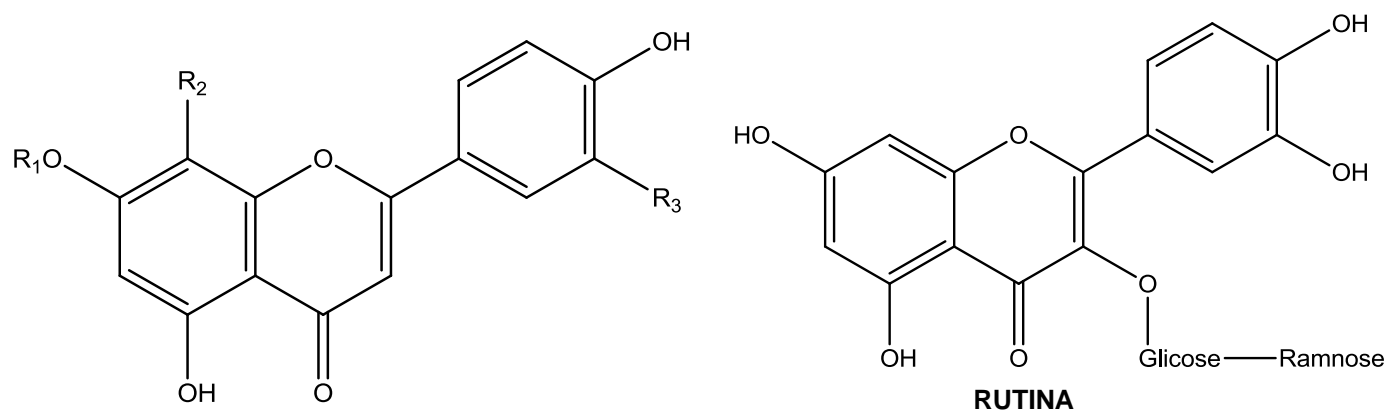


COMPOSTO	R ₁	R ₂	R ₃
Vitexina	H	Glicose	H
Orientina	H	Glicose	OH
Luteolina-7-O-glicuronídeo	Ác. Glicurônico	H	H
Luteolina-7-O-rutinosídeo	Glicose - Ramnose	H	H

Estudos anteriores mostram a presença de flavonas, tanto C-glicosilflavonas quanto O-glicosilflavonas em extratos de espécies da família Ochnaceae, principalmente em espécies do gênero *Ouratea* (FIDELIS *et al*, 2014). Vitexina e Orientina foram identificados na espécie *Ouratea hexasperma* (SUZART *et al*, 2012).

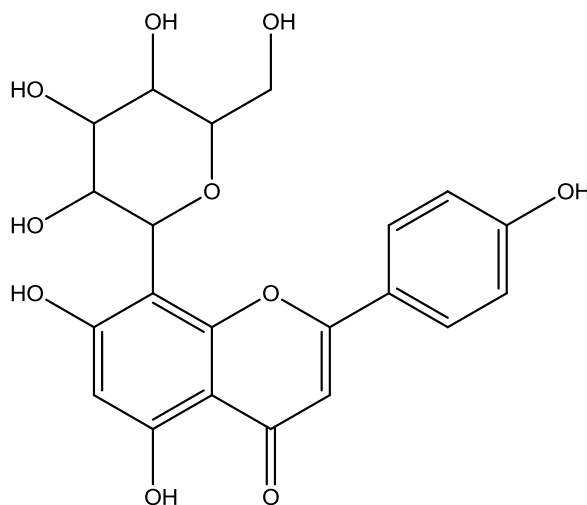
As quatro flavonas apresentadas e o flavonol rutina foram identificados no extrato etanólico das folhas de *O. castaneifolia*. No extrato etanólico de *O. semiserrata* identificou-se vitexina e rutina. A figura 19 a seguir, apresenta os dados espectrométricos encontrados experimentalmente para estes flavonoides.

Figura 19: Estruturas das flavonas e flavonol encontradas nos extratos de *Ouratea* por UPLC-UV-MS no presente trabalho



COMPOSTO	TR(min)	[M - H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)	λ max(nm)
Vitexina	2,9	431,2	341; 311; 283	264; 335
Orientina	2,5	447,0	449; 151; 299; 163; 327	265; 340
Luteolina-7-O-glicuronídeo	2,4	447,1	447; 271; 151	265, 348
Luteolina-7-O-rutinosídeo	2,7	593,3	297; 269; 285.	265; 342
Rutina	2,4	609,3	301; 463	268, 334

5.5.1 Vitexina

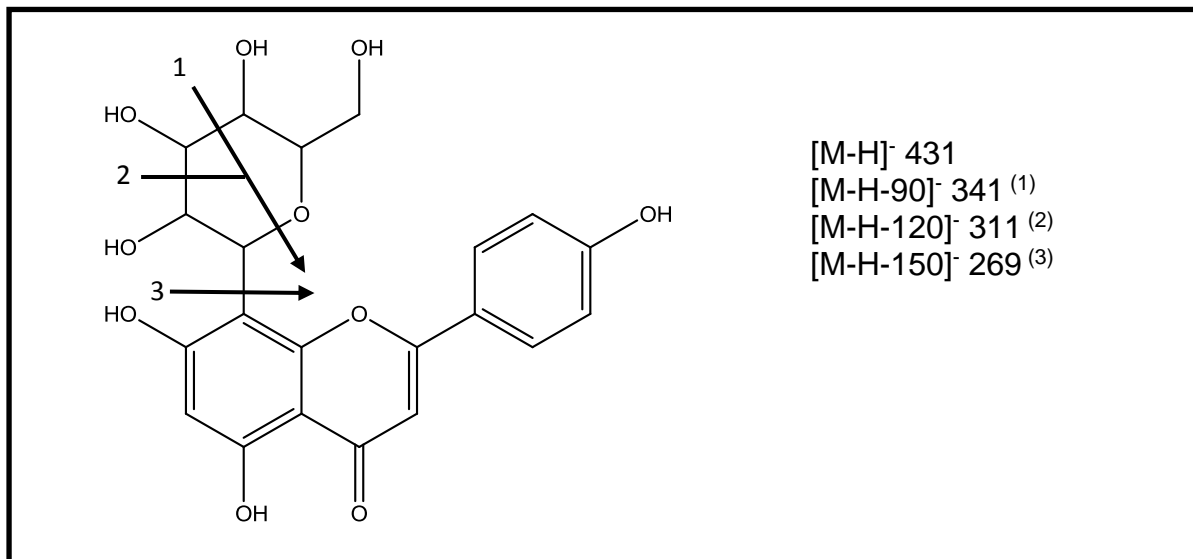


O espectro no UV da molécula detectada por CLUE em T_R 2,64min nas folhas de *Ouratea castaneifolia* e caule de *Ouratea semiserrata*, apresenta absorções com λ_{max} em 268 e 335nm (Figura 26) indicando se tratar de uma flavona, uma vez que a absorção da banda I se encontra entre 304-350nm e a banda II entre 250-280nm. As absorções no UV estão próximas da descrita na literatura para a flavona Vitexina (MABRY *et al*, 1970;)

Em relação à espectrometria de massas, as análises de fragmentações realizadas por ESI no modo negativo obtiveram fragmentos semelhantes às fragmentações propostas na literatura para a vitexina e flavona C-glicosiladas, pois apresenta fragmentações relacionadas ao açúcar, gerando perda de -120Da, -90Da (Figura 20 e 25), sugerindo então, que a molécula detectada nos extratos etanólicos se trata da vitexina (SICILIANO *et al*, 2004; ZHANG *et al*, 2010).

Um trabalho realizado por Li e colaboradores em 2002 demonstrou atividade antiviral *in vitro* da vitexina contra o vírus Parainfluenza 3 (Li *et al*, 2002). Pesquisas na literatura não mostraram a presença desta flavona em *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea semiserrata*, sendo este trabalho o primeiro a sugerir a presença de vitexina nestas espécies.

Figura 20: Proposta de fragmentações da vitexina



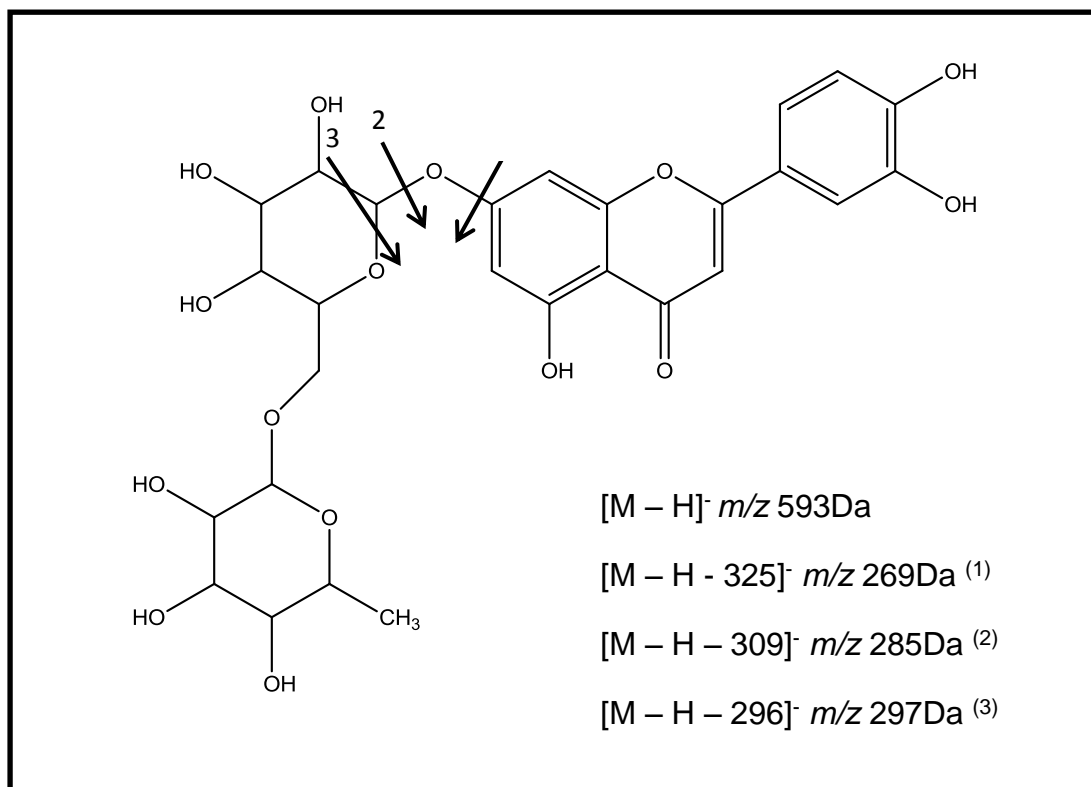
5.5.2 Luteolina-7-O-rutinosídeo

O espectro no UV da molécula detectada por CLUE em 2,79min, detectado nas folhas de *Ouratea castaneifolia*, apresentou duas bandas de absorção em com λ_{\max} de 265 e 342nm (Figura 28), sugerindo tratar-se de flavona, pois são absorções típicas dessa classe de metabólitos e próximas das descritas para a flavona Luteolina-7-O-rutinosídeo.

No espectro de massa ESI no modo negativo, obteve-se a espécie desprotonada m/z 593Da (Figura 21 e 27), demonstrando tratar-se de uma molécula com massa molecular de 594Da. Os fragmentos apresentados experimentalmente estão de acordo com os fragmentos apresentados na literatura para a Luteolina-7-O-rutinosídeo (MABRY *et al*, 1970; SICILIANO *et al*, 2004; VEITCH *et al*, 2010; WANG *et al*, 2003). Com base nos dados, podemos sugerir que a molécula detectada no extrato das folhas de *Ouratea castaneifolia* se trata da Luteolina-7-O-rutinosídeo.

Pesquisas na literatura científica não mostraram presença desta flavona na espécie *Ouratea castaneifolia*, sendo este trabalho o primeiro a sugerir a presença de luteolina-7-O-rutinosídeo na espécie citada.

Figura 21: Proposta de fragmentações da luteolina-7-rutinosídeo



5.5.3 Rutina

Na análise por CLUE detectou-se uma molécula no T_R de 2,4 min cuja análise no ultravioleta apresentou as bandas de absorção λ_{max} 268 e 334nm (Figura 24), próximas da absorção descrita na literatura para esta molécula (BOULET *et al*, 2017). Nas análises espectrométricas por ESI no modo negativo observou-se a molécula desprotonada com m/z de 609,3Da, sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular de 610Da. Nas análises por EM/EM observamos os fragmentos com m/z 463 e 301Da que foram atribuídos às perdas de um resíduo de ramnose $[(M-H) -146$ Da] seguido da perda do resíduo de glicose $[(M-146) -162$ Da]. Os dados obtidos no presente trabalho comparados com resultados de análises de uma amostra autêntica de rutina permitiram confirmar a presença deste flavonol no extrato de caules de *Ouratea semiserrata* e folhas de *Ouratea castaneifolia*.

Velandia *et al* em 2002 detectou a presença de rutina na espécie *Ouratea semiserrata*, o que corrobora com o achado neste trabalho nesta

mesma espécie vegetal. Na literatura científica não foi detectada rutina em *Ouratea*, sendo este trabalho o primeiro a sugerir a presença de rutina nesta espécie. O espectro de massa e os fragmentos propostos relacionados à rutina estão apresentados nas Figuras 22, 23.

Figura 22: Proposta de fragmentações da Rutina

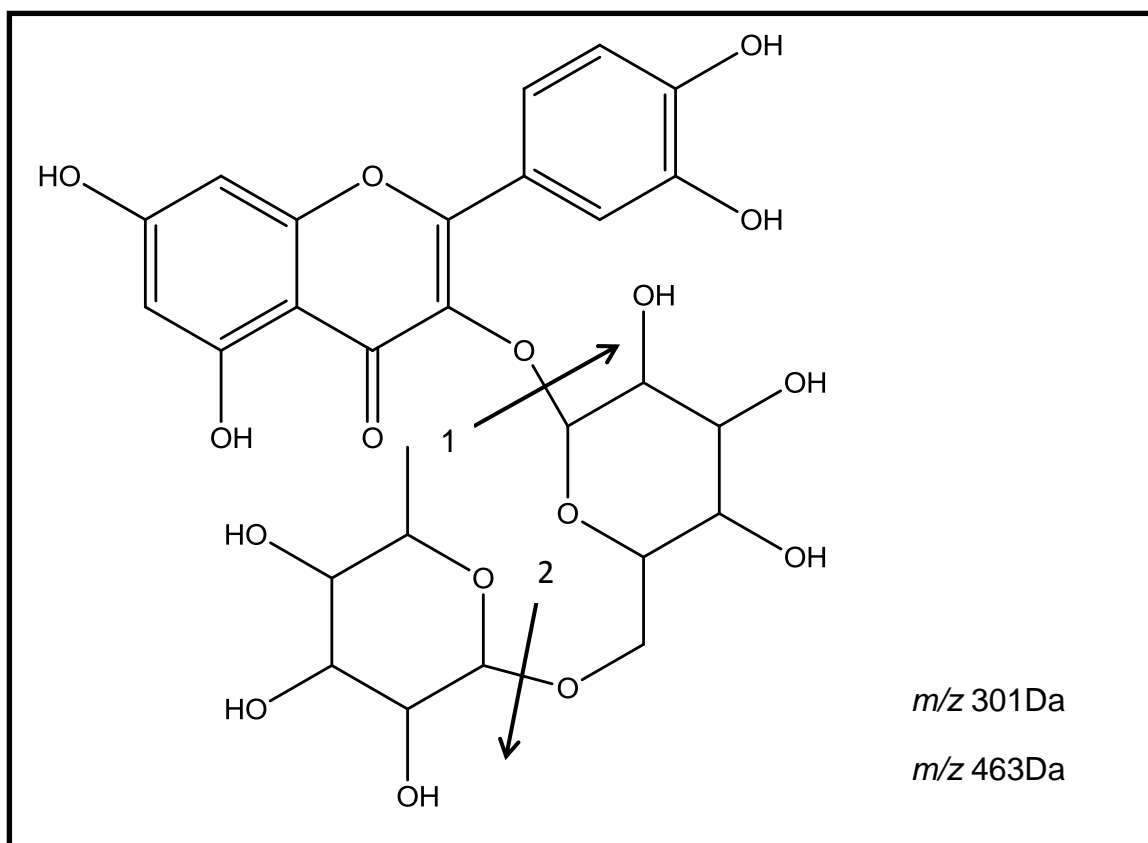


Figura 23: Espectro de massa EM²-ESI⁻ da substância com T_R 2,4min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata* relacionado ao flavonol Rutina

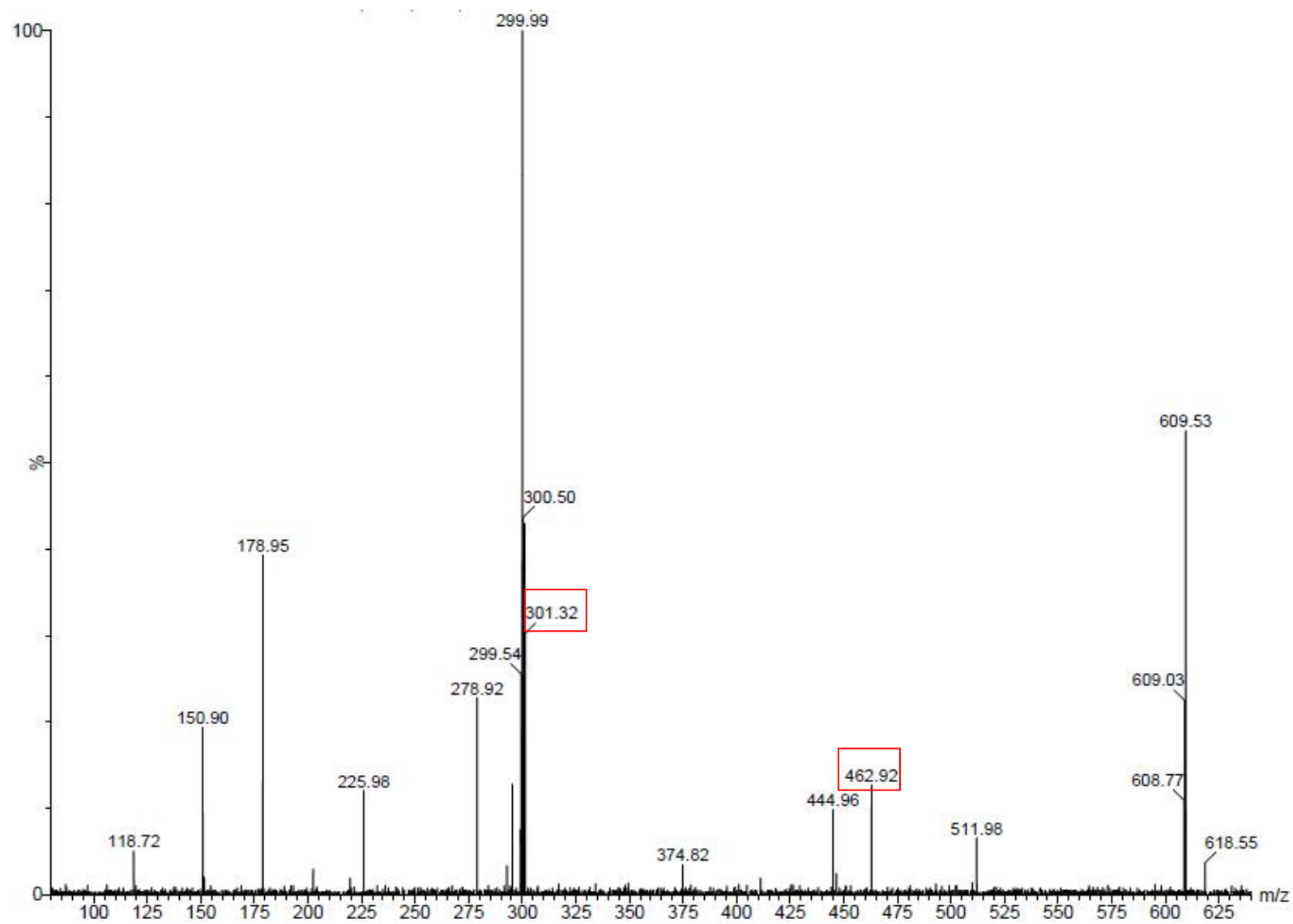


Figura 24: Espectro de ultravioleta da substância com T_R 2,4min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata* relacionado ao flavonol Rutina



Figura 25: Espectro de massa EM²-ESI da substância com T_R 2,64min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata* relacionado à flavona Vitexina

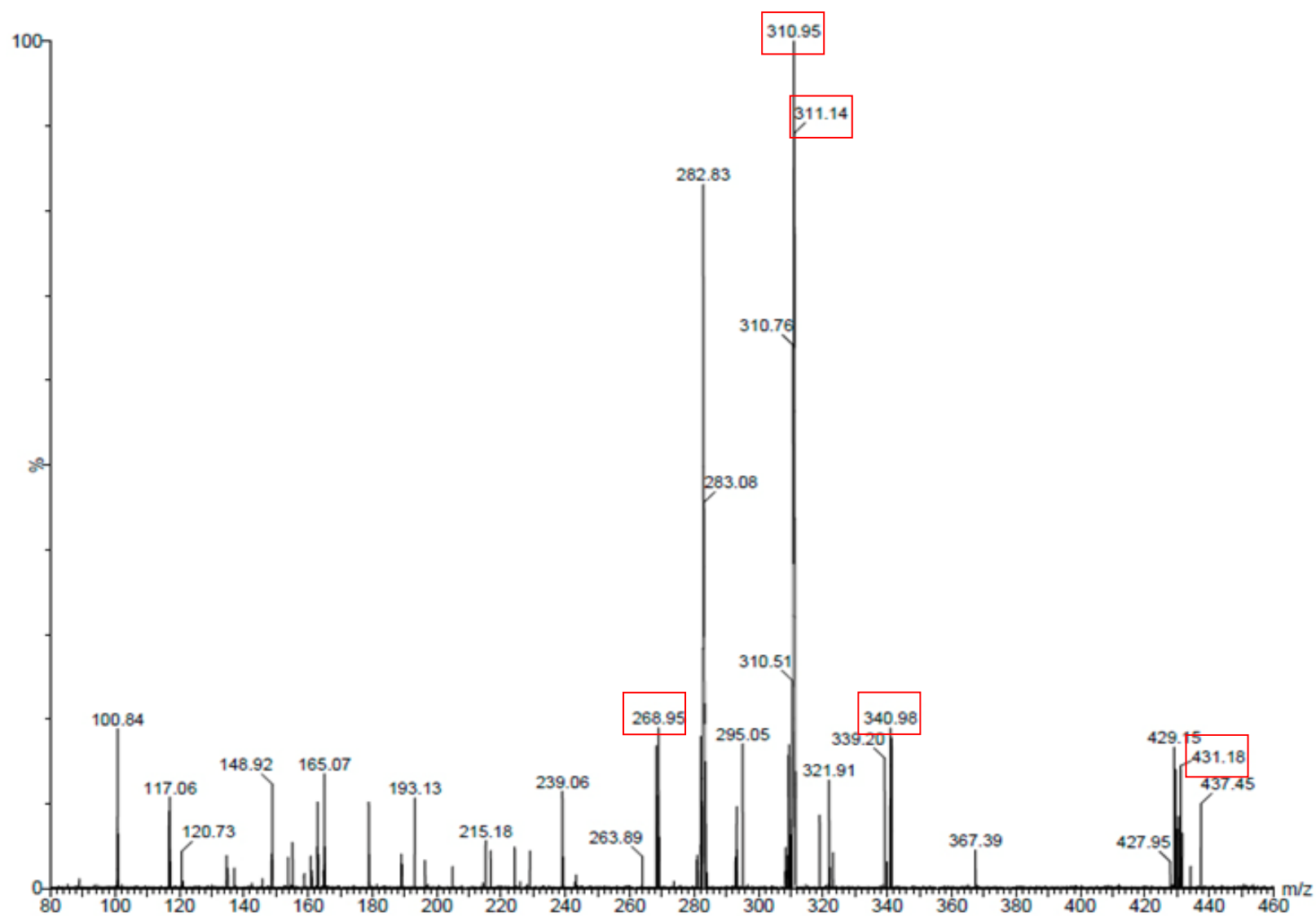


Figura 26: Espectro no ultravioleta da substância com T_R 2,64min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata* relacionado à flavona Vitexina

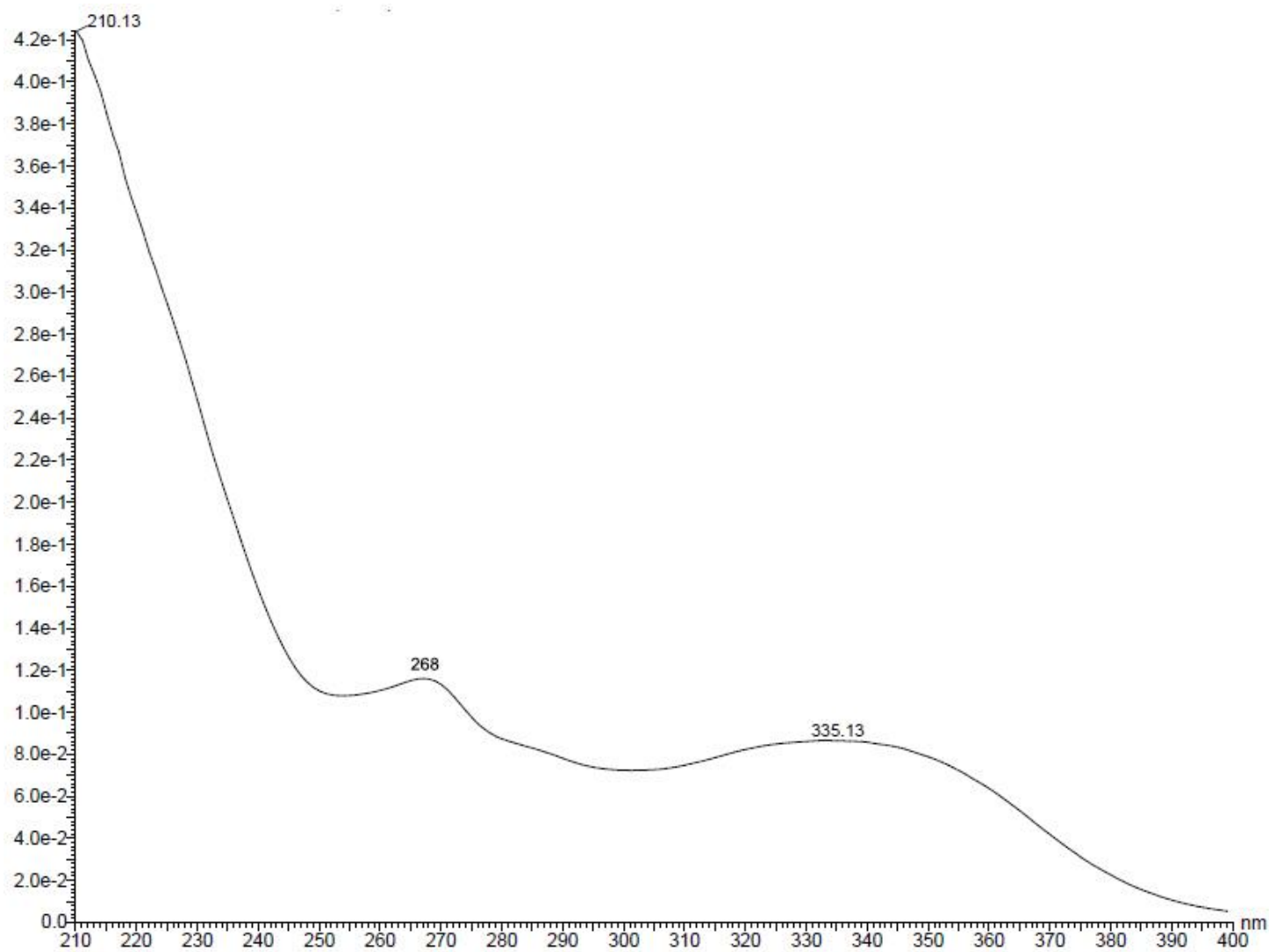


Figura 27: Espectro de massa MS²-ESI da substância com T_R 2,79min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* relacionada à flavona luteolina-7-O-rutinosídeo

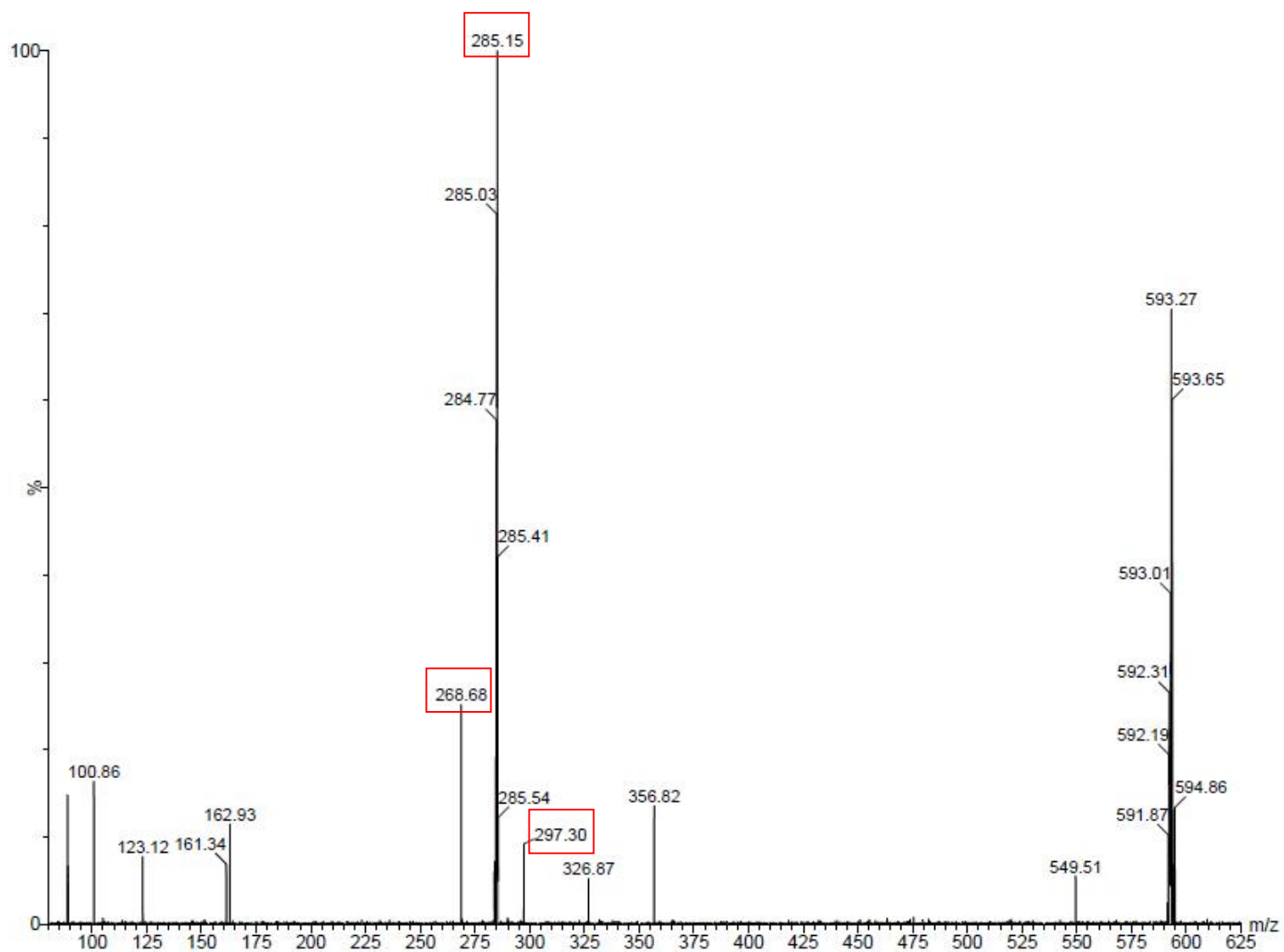


Figura 28: Espectro no ultravioleta da substância com T_R 2,79min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* relacionado à flavona luteolina-7-O-rutinosídeo



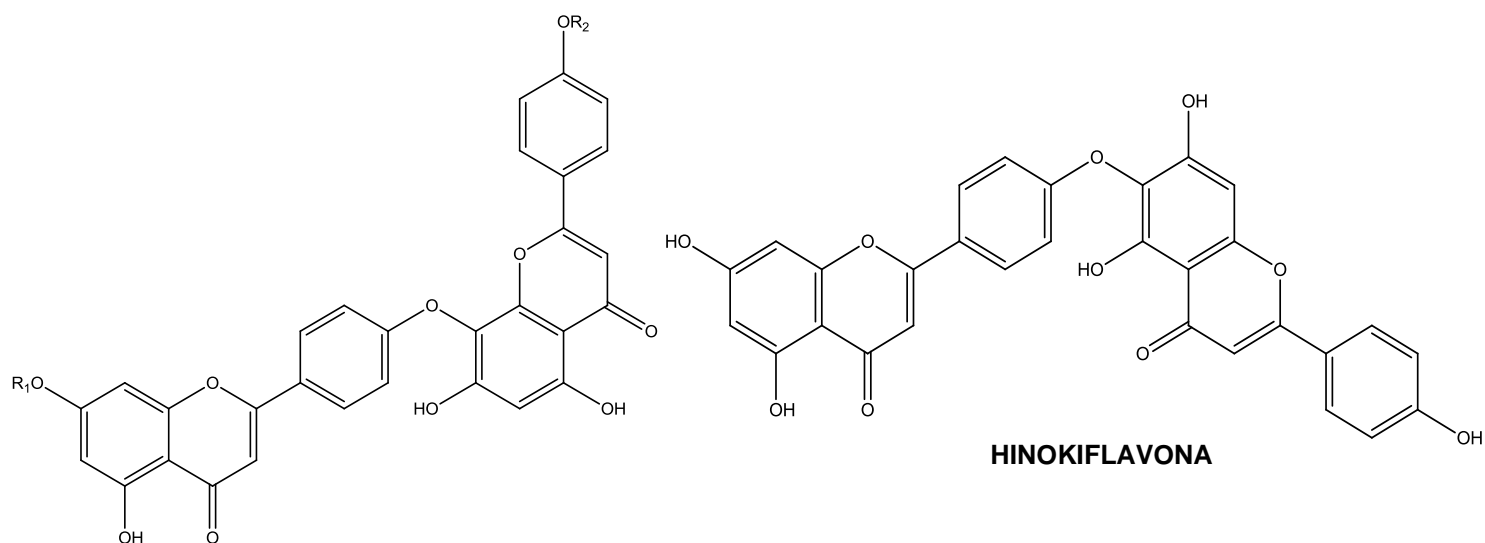
5.6 Biflavonoides

Os biflavonoides são caracterizados como um flavonoide ligado a outro geralmente pela posição C-6 ou C-8, formando assim um dímero de flavonoide (BRUNETON, 2001). A família Ochnaceae se caracteriza por ser uma grande fonte de biflavonoides, principalmente em espécies do gênero *Ouratea*, o que faz dos biflavonoides marcadores químicos deste gênero (DANIEL *et al*, 2005; FELÍCIO *et al*, 1995; FIDELIS *et al*, 2012; NASCIMENTO *et al*, 2009; SUZART *et al*, 2007; VELANDIA *et al*, 2002). No presente trabalho esta classe de produtos naturais foi detectada e caracterizada principalmente nos extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis*. Por questões de descrições foram agrupadas conforme a ligação das duas unidades flavônicas (C - O e C – C).

5.6.1 Biflavonoides ligados por C – O

Entre os dez biflavonoides identificados nos extratos etanólicos das espécies vegetais do presente trabalho, três deles caracterizam-se por um monômero estar ligado ao substituinte hidroxila do outro monômero. A figura 29, a seguir, apresenta a estrutura molecular sugerida para os biflavonoides com ligação C – O detectados nas espécies vegetais estudadas.

Figura 29: Estruturas dos biflavonoides com ligação C-O encontrados no extrato etanólico de espécies do gênero *Ouratea*

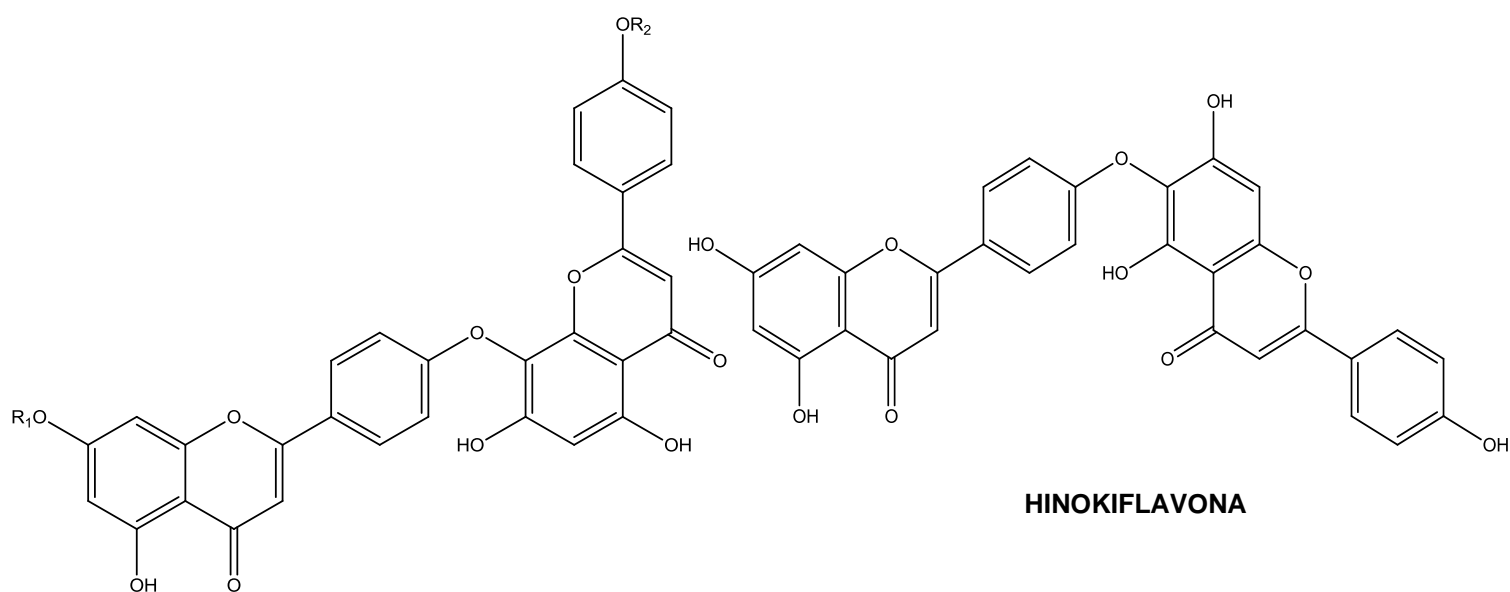


NOME	R ₁	R ₂
Lanaraflavona	H	H
7,4''-di-O-metil-lanaraflavona	Metil	Metil

Através de análises por CLUE, detectaram-se três isômeros nos tempos de retenção 4.7, 5.0 e 5.7 min apresentando a espécie desprotonada m/z 537Da por espectrometria de massas. Através de comparação com biflavonoides com esta mesma massa molecular já descrita na literatura científica identificada em espécie do gênero *Ouratea* e analisando os fragmentos obtidos experimentalmente por espectrometria de massa, sugere-se que os compostos isômeros tratam-se dos biflavonoides lanaraflavona, hinokiflavona e amentoflavona, sendo esta última descrita no item 5.6.2.1.

A Figura 30, a seguir, apresenta os dados espectrométricos dos biflavonoides com ligação C – O identificados nos extratos das espécies vegetais analisadas neste trabalho.

Figura 30: Dados encontrados experimentalmente por CLUE-UV-EM para biflavonoides com ligação C-O



COMPOSTO	T _R (min)	[M - H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)	λ max(nm)
Lanaraflavona	4.7	537,1	443; 415; 375; 281	272, 332
7,4''-di-O-metil-lanaraflavona	6,9	565,2	389; 147	269; 330
Hinokiflavona	5.0	537,1	417; 399; 307	271, 330

O biflavonoide lanaraflavona e outros compostos estruturalmente semelhantes, como os isômeros 7,7''-di-O-metil-lanaraflavona e 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona, já foram identificados em espécies da família Ochnaceae como na *Ouratea hexasperma* e *Ouratea semiserrata* (DANIEL *et al*, 2005; VELANDIA *et al*, 2002).

O biflavonoide lanaraflavona foi identificado nos extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* e no extrato de caules de *Ouratea semiserrata*. O biflavonoide hinokiflavona foi identificado nos extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis*.

O biflavonoide detectado em 6,3min com espécie desprotonada 565Da o qual sugere-se ser 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona, foi identificado no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*.

✓ 7,4'''-di-O-metil-lanaraflavona

Na análise por CLUE detectou-se uma substância com T_R de 6,8 min, no extrato etanólico das folhas de *Ouratea castaneifolia*, cujo espectro no ultravioleta (figura 33) apresentou bandas de absorção λ_{max} em 269 e 330nm, condizentes com as absorções de biflavonas (ZHANG *et al*, 2011)

No espectro de massa utilizando ESI no modo negativo, a substância apresentou espécie desprotonada m/z 565Da, sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular de 566Da. Os dados de UV, a espécie desprotonada e os fragmentos obtidos por EM² analisados experimentalmente e comparados com dados descrito na literatura para esta molécula, corroboram com a proposta de estrutura para 7,4'''-di-O-metil-lanaraflavona.

Um estudo realizado por Velandia *et al* em 2002, detectou a biflavona 7,4'''-di-O-metil-lanaraflavona em extrato vegetal de galhos e folhas de *Ouratea semiserrata*. Uma pesquisa pela literatura científica não demonstrou identificação desta molécula em *Ouratea castaneifolia*, sendo este trabalho o primeiro a sugerir a presença deste biflavonoide nesta espécie.

A estrutura e os dados espectrométricos estão mostrados nas figuras 31, 32 e 33.

Figura 31: Proposta de fragmentações da 7,4'''-di-O-metil-lanaraflavona

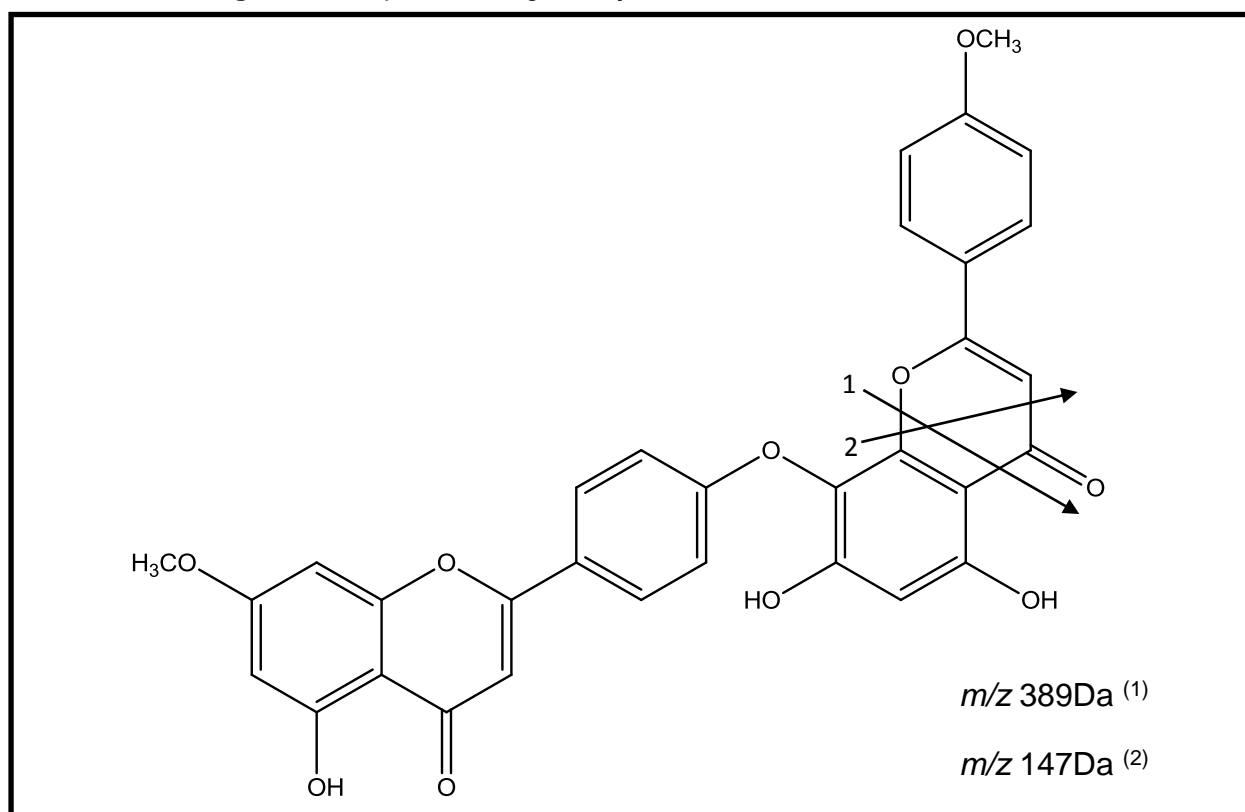


Figura 32: Espectro de massa EM²-ESI⁻ da substância COM T_R de 6,8min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* relacionado ao biflavonoide 7,4'''-di-O-metil-lanaraflavona

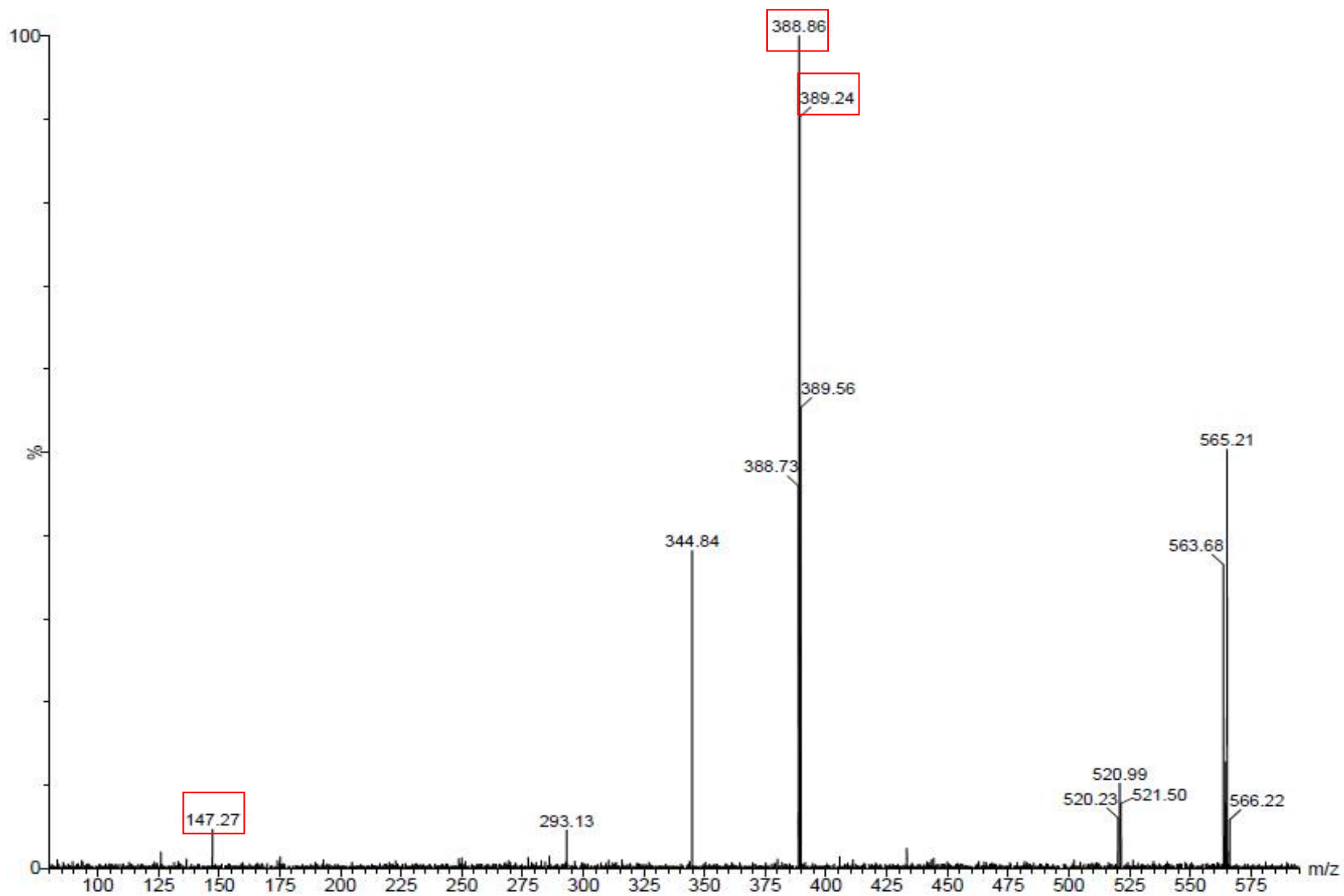
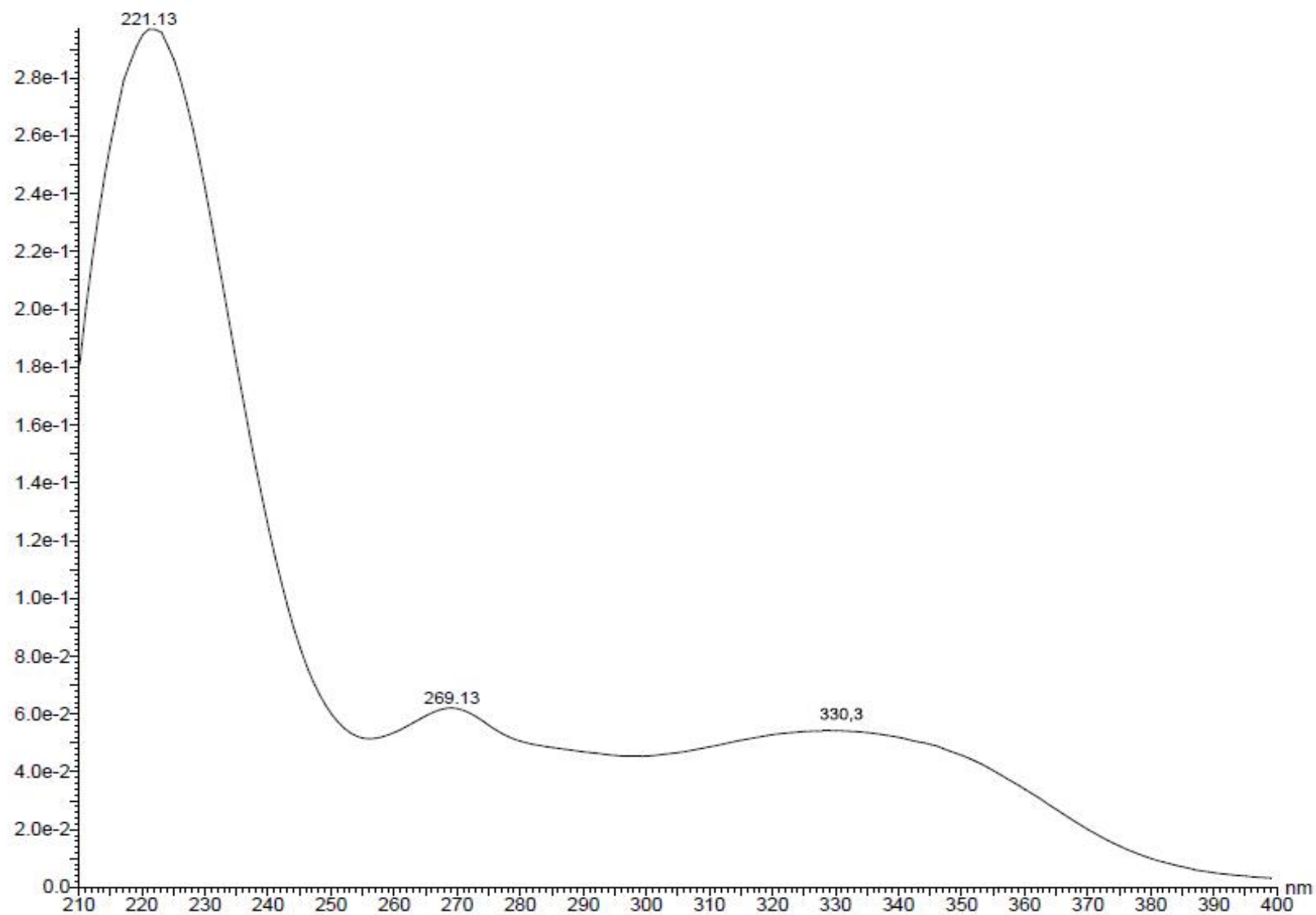


Figura 33: Espectro no ultravioleta da substância T_R de 6,8min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e relacionado ao biflavonoide 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona



5.6.2 Biflavonoides ligados por C – C

Entre os dez biflavonoides identificados nos extratos etanólicos das espécies vegetais do presente trabalho, sete deles caracterizam-se por um monômero estar ligado a outro diretamente por ligação entre carbonos e estão presentes nos extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis*. As estruturas moleculares e os dados espectrométricos das substâncias identificadas estão mostrados nas figuras 34 e 35.

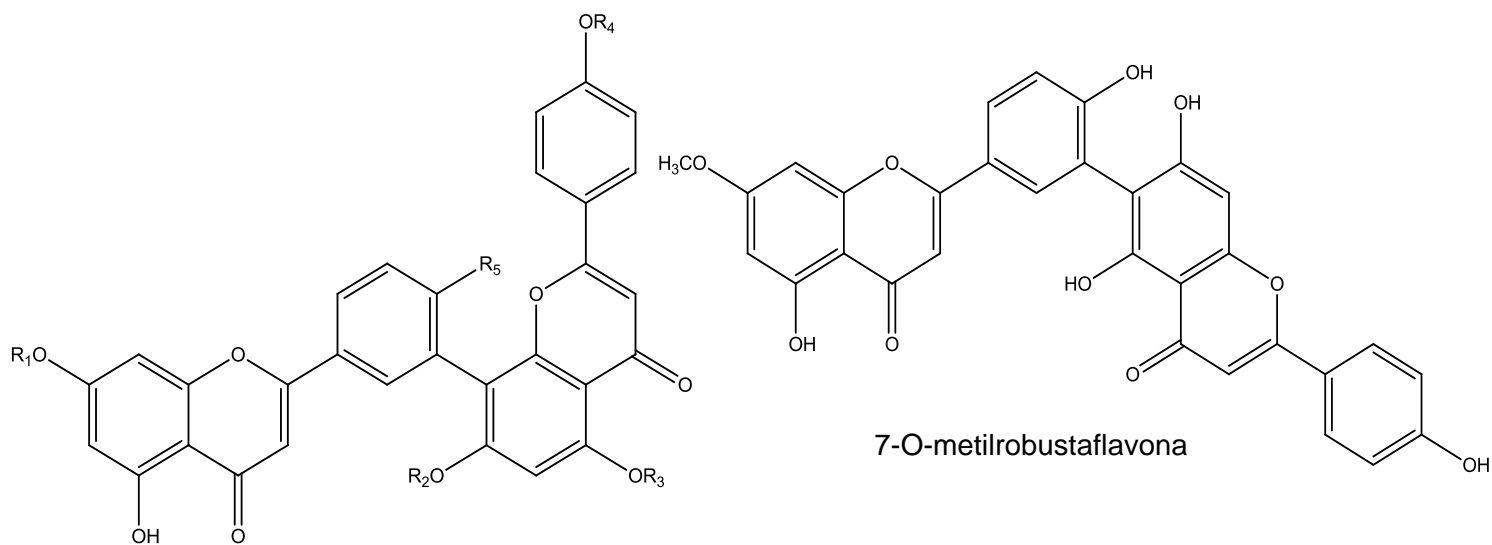
Foram observados isômeros nos tempos de retenção 6.4, 6.7, 6.9, 7.2 e 7.6 min, que apresentaram a espécie desprotonada m/z 565Da. Através de dados encontrados na literatura de biflavonoides detectados em espécies vegetais do gênero *Ouratea* e dos padrões de fragmentação por espectrometria de massas obtidas experimentalmente, foi possível identificar o biflavonoide 7,4''-di-O-metil-lanaraflavona no tempo de retenção 6.9 min (item 5.6.1). Os compostos 7,7''-di-O-metilagathisflavona, 6,6''-bigenkwanina e 7,7''-di-O-metilamentoflavona foram identificados nos tempos 6.4 e 7,2 min, porém, através dos fragmentos obtidos por espectrometria de massas não é possível diferenciar qual das três estruturas são equivalentes a estes tempos de retenção. O biflavonoide 7'',4''-di-O-metilamentoflavona, através das fragmentações no espectro de massas, foi possível concluir que se trata dos tempos de retenção correspondentes ao 6,7 ou 7,6 min.

5.6.2.1 Biflavonoides ligados por IC3'–IIC8'' e IC3'–IIC6''

Identificou-se quatro biflavonoides com ligação entre o carbono 3' e 8'', e apenas um com ligação entre o carbono 3' e 6'' conforme mostrado nas figuras 34 e 35.

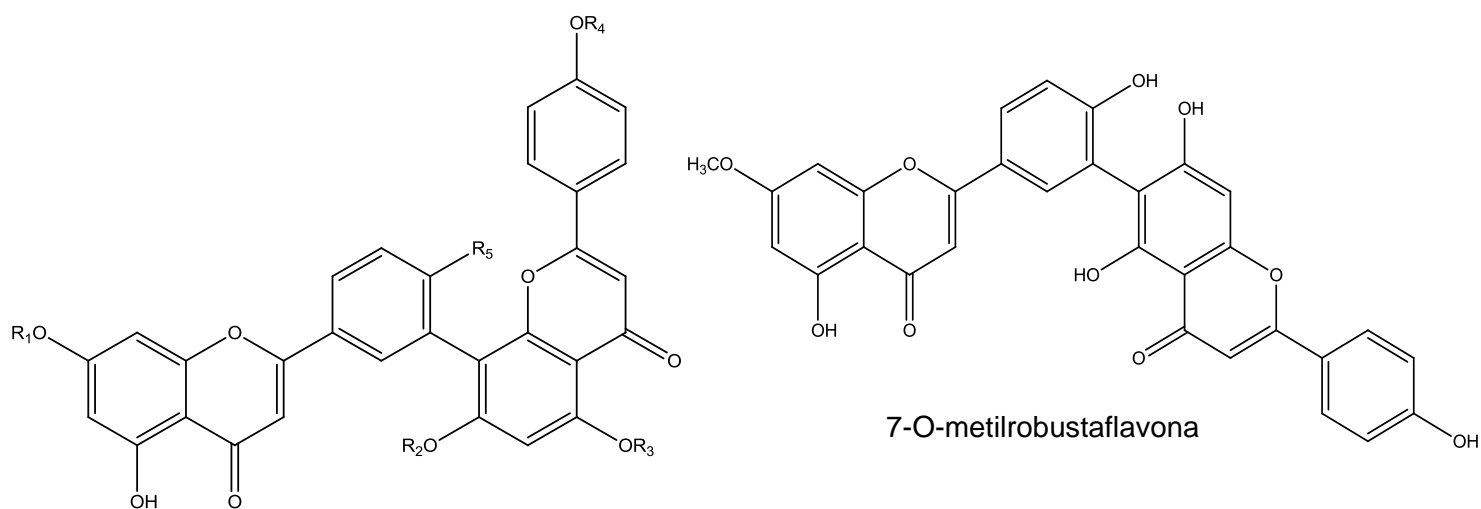
Todos os cinco biflavonoides com ligação C-C foram identificados no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*, já no extrato etanólico de folhas de *Ouratea spectabilis* foram identificados Amentoflavona, 7'',4''-di-O-metil-amentoflavona, 7,7''-di-O-metil-amentoflavona e 7-O-metilrobustaflavona.

Figura 34: Biflavonoides com ligação IC3'–IIC8'' e IC3'–IIC6'' encontrados no extrato etanólico de folhas de espécies do gênero *Ouratea*



NOME	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Amentoflavona	H	H	H	H	OH
7'',4'''-di-O-metil-amentoflavona	H	Metil	H	Metil	OH
7,7''-di-O-metil-amentoflavona	Metil	Metil	H	H	OH
4',4''',7,7''-tetra-O-metil-amentoflavona	Metil	Metil	H	Metil	Metoxila

Figura 35: Dados encontrados experimentalmente por CLUE-UV-EM para biflavonoides com ligação IC3'–IIC8'' e IC3'–IIC6'' detectados nos extratos etanólicos de folhas de espécies do gênero *Ouratea*

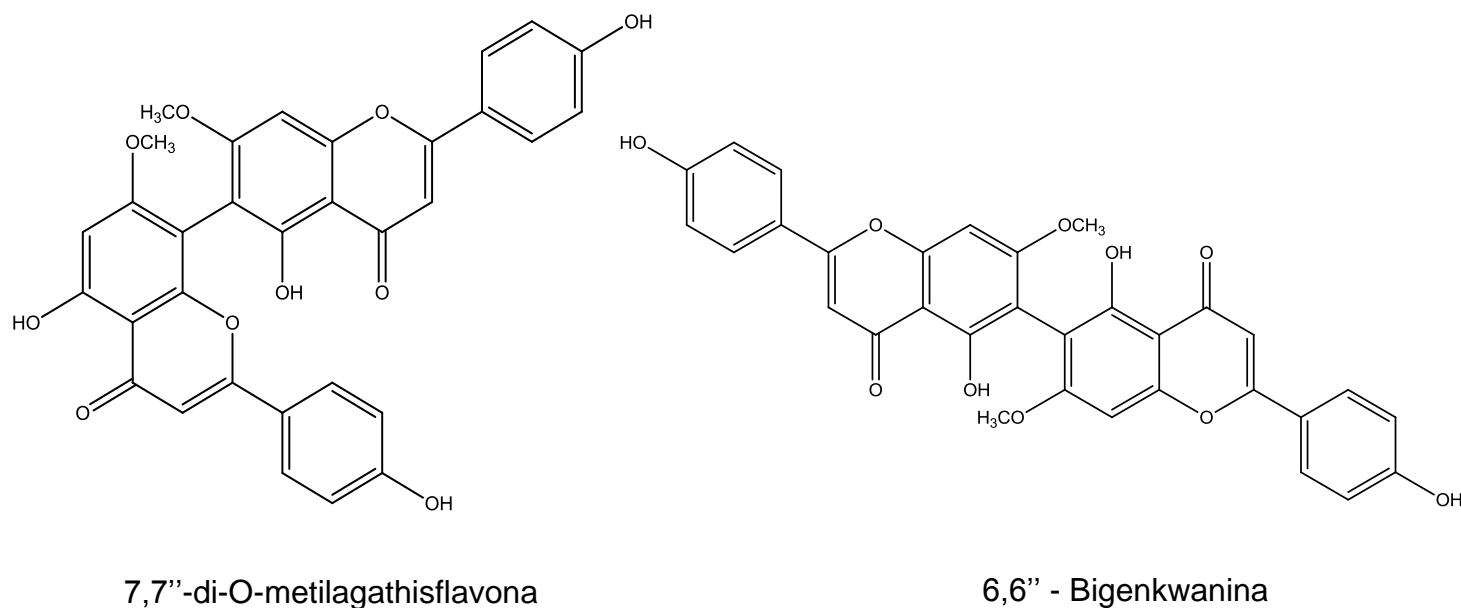


COMPOSTO	TR (min)	[M - H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)	λ max (nm)
Amentoflavona	5,7	537,1	415; 375; 269	270, 328
7'',4'''-di-O-metil-amentoflavona	7,6 / 6,7	565,0	471; 402; 389; 228; 151	270; 321 / 269; 330
7,7''-di-O-metil-amentoflavona	6,3 / 7,2	565,2	445; 403; 389; 229;	269; 330
4',4''',7,7''-tetra-O-metil-amentoflavona	2,7	593	285; 162; 132	267; 342
7-O-metilrobustaflavona	5,8	551	457,0; 431,0; 389,0	269; 333

5.6.2.2 Biflavonoides ligados por IC6 – IIC8'' e IC6 – IIC6''

No extrato etanólico de folhas da espécie *Ouratea* foram detectados um biflavonoide com ligação entre o carbono 6 e o 8'' e outro biflavonoide com ligação entre o carbono 6 e 6'' conforme mostra a figura 36.

Figura 36: Biflavonoides com ligação IC6 – IIC8'' e IC6 – IIC6'' encontrados no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*



COMPOSTO	TR (min)	[M - H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)	λ max (nm)
7,7''-di-O-metilagathisflavona	6,3 / 7,2	565,2	445; 403	269; 330
6,6'' - Bigenkwanina	6,3 / 7,2	565,2	445; 403	269; 330

✓ **7,7''-di-O-metil-amentoflavona**

Na análise por CLUE foram detectados dois isômeros com T_R 6,3 e 7,2 min cujas absorções no ultravioleta produziram bandas com λ_{max} 270 e 330nm em ambos os isômeros (Figura 39), mostrando se tratarem de biflavonas (MABRY *et al*, 1970; ZHANG *et al*, 2011).

Nas análises do espectro de massas por ESI no modo negativo, ambos os isômeros apresentaram espécie desprotonada m/z 565Da (Figura 38) sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular de 566Da e as fragmentações propostas na Figura 37 sugere que um dos isômeros possivelmente é a biflavona 7,7''-di-O-metilamentoflavona, que foi isolada anteriormente de extratos da espécie *Ouratea castaneifolia* (NASCIMENTO *et al*, 2009), porém com os dados que temos até o momento não é possível inferir qual dos dois isômeros se trata desta molécula.

O presente trabalho detectou a presença da molécula proposta em *Ouratea castaneifolia*, corroborando assim, com o trabalho do Nascimento *et al* em 2009. Além da *Ouratea castaneifolia*, também detectou-se esta biflavona em extrato etanólico de folhas de *Ouratea sepctabilis*.

Figura 37: Proposta de fragmentações da 7,7''-di-O-metilamentoflavona

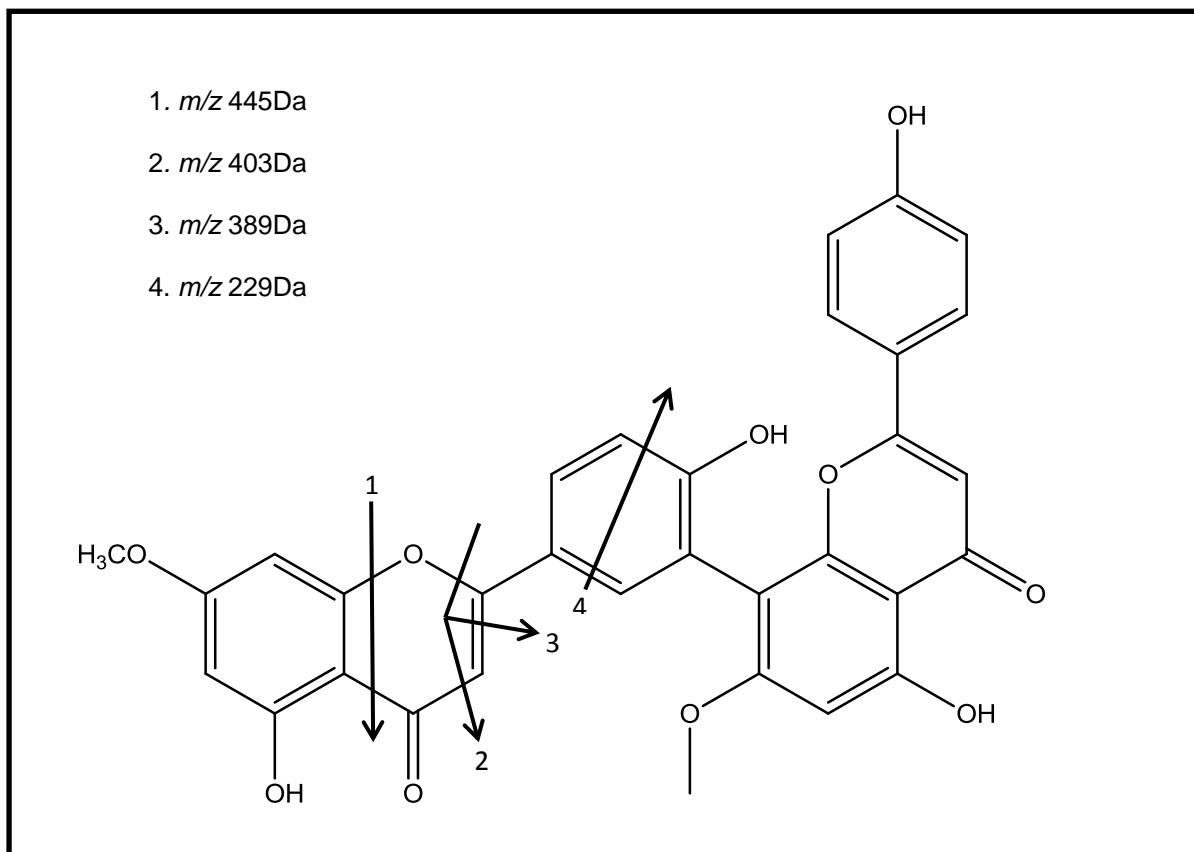


Figura 38: Espectro de massa EM²-ESI dos isômeros I e II identificados no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* relacionado aos biflavonoides 7,7''-di-O-metilamentoflavona, 7,7''-di-O-metilagathisflavona e 6,6''-bigenkwanina

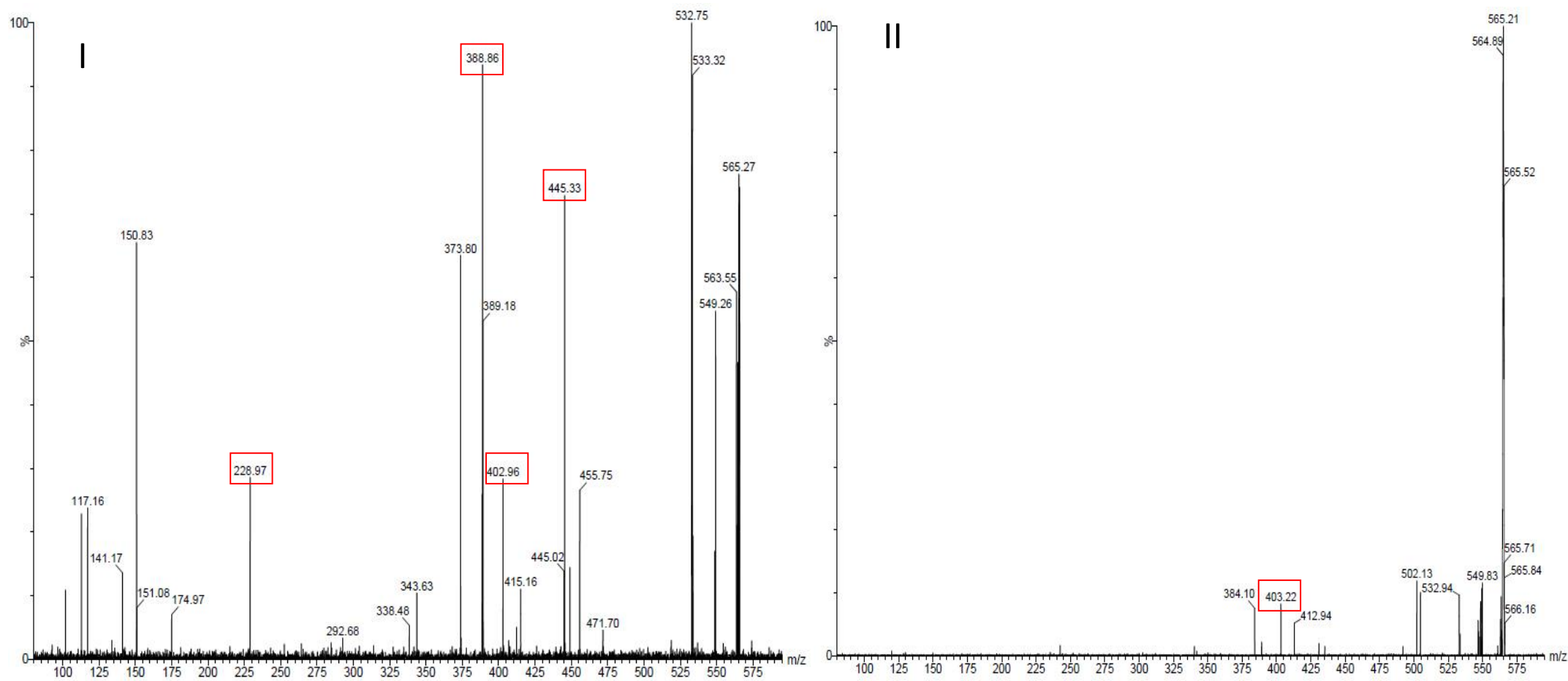
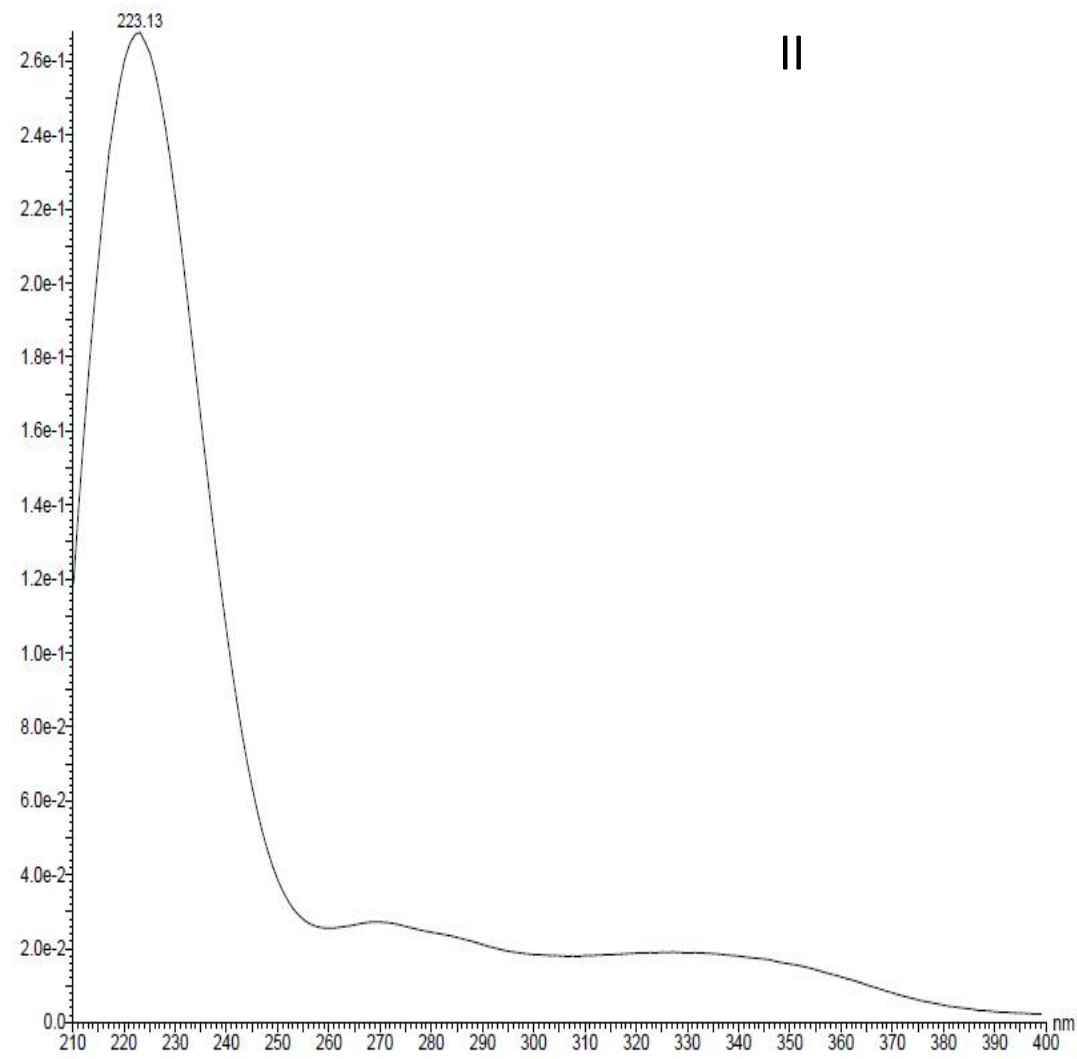
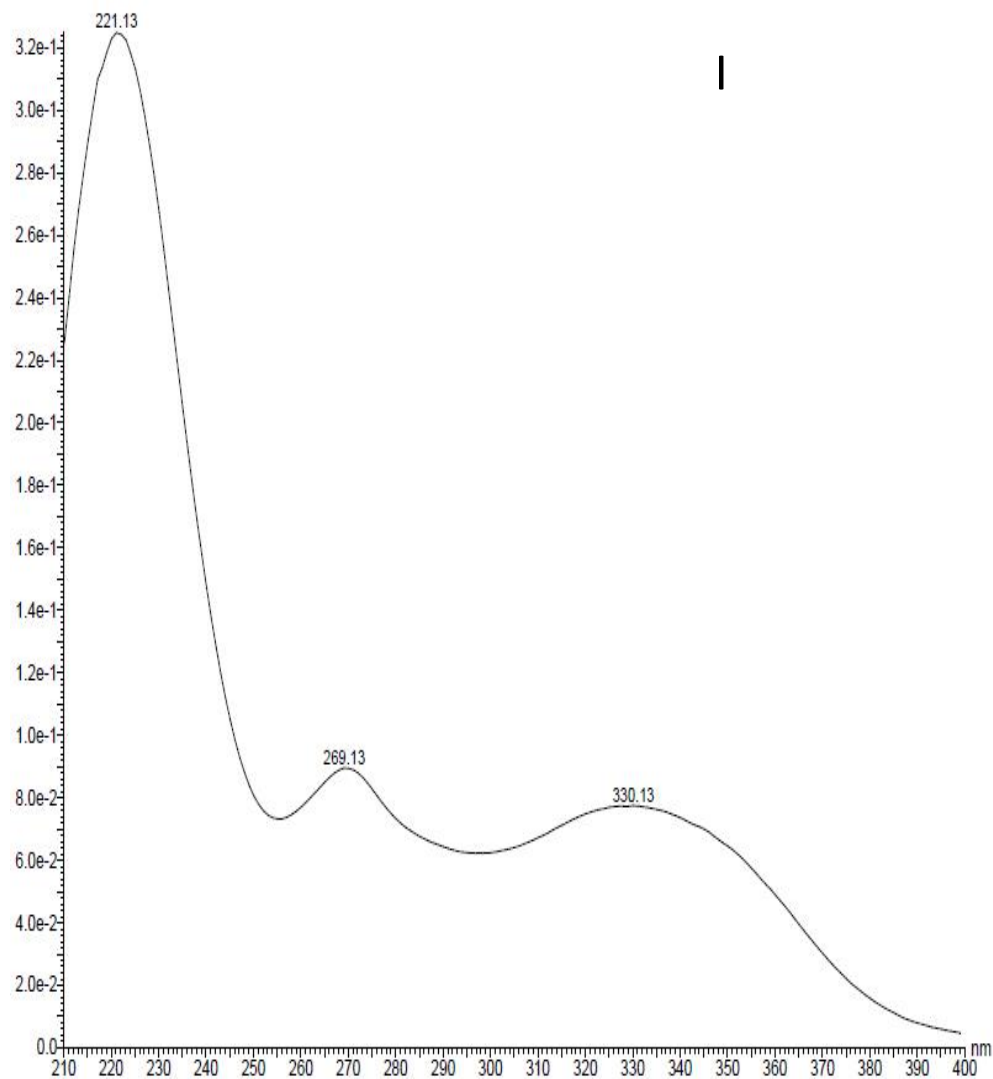


Figura 39: Espectro no ultravioleta dos isômeros identificado no extrato etanólico das espécies do gênero *Ouratea* relacionado ao biflavonoide 7,7''-di-O-metilamentoflavona, 7,7''-di-O-metilagathisflavona e 6,6''-bigenkwanina



✓ 7-O-metilrobustaflavona

Na análise por CLUE, no tempo de retenção 5,8min foi detectado uma substância que apresentou bandas de absorção no ultravioleta com λ_{\max} de 269 e 333nm (Figura 42), condizente com o esperado para biflavonas e próximo do descrito na literatura para 7-O-metilrobustaflavona (Velandia *et al*, 2002; ZHANG *et al*, 2011).

Na análise do espectro de massa por ESI no modo negativo, observou-se a espécie desprotonada com m/z 551Da, sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular de 552Da e nas análises de EM² foram observados fragmentos que corroboram com as propostas de fragmentação descritas na Figura 40 e 41, sugerindo tratar-se da 7-O-metilrobustaflavona.

A molécula proposta foi detectada, no presente trabalho, nos extratos etanólicos de folhas das espécies *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis*. Através de buscas na literatura científica, não foi encontrado relato deste biflavonoide nas espécies citadas, o que faz deste trabalho o primeiro neste aspecto.

Figura 40: Proposta de fragmentações da 7-O-metilrobustaflavona

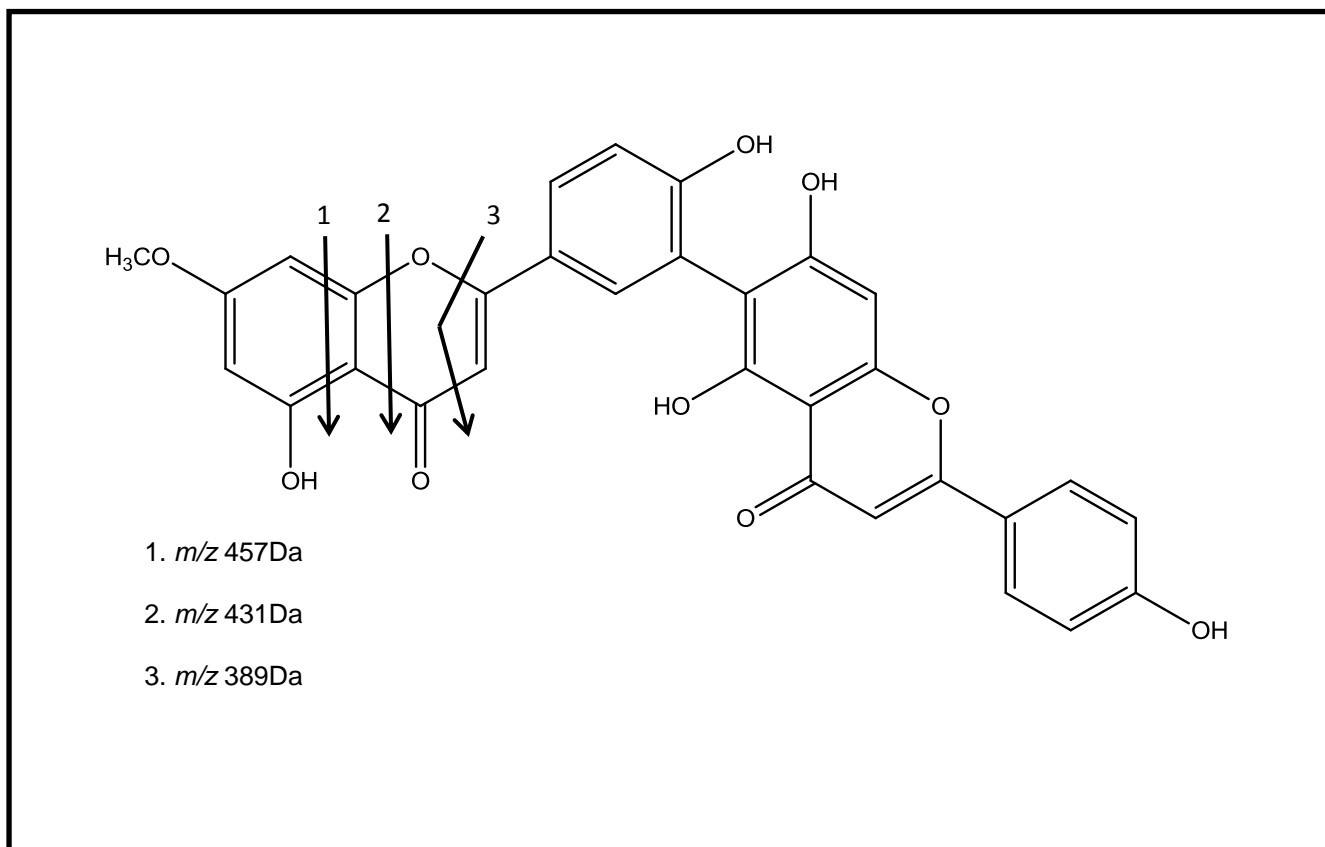


Figura 41: Espectro de massa EM²-ESI da substância com T_R 5,8min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* relacionado ao biflavonoide 7-O-metilrobustaflavona

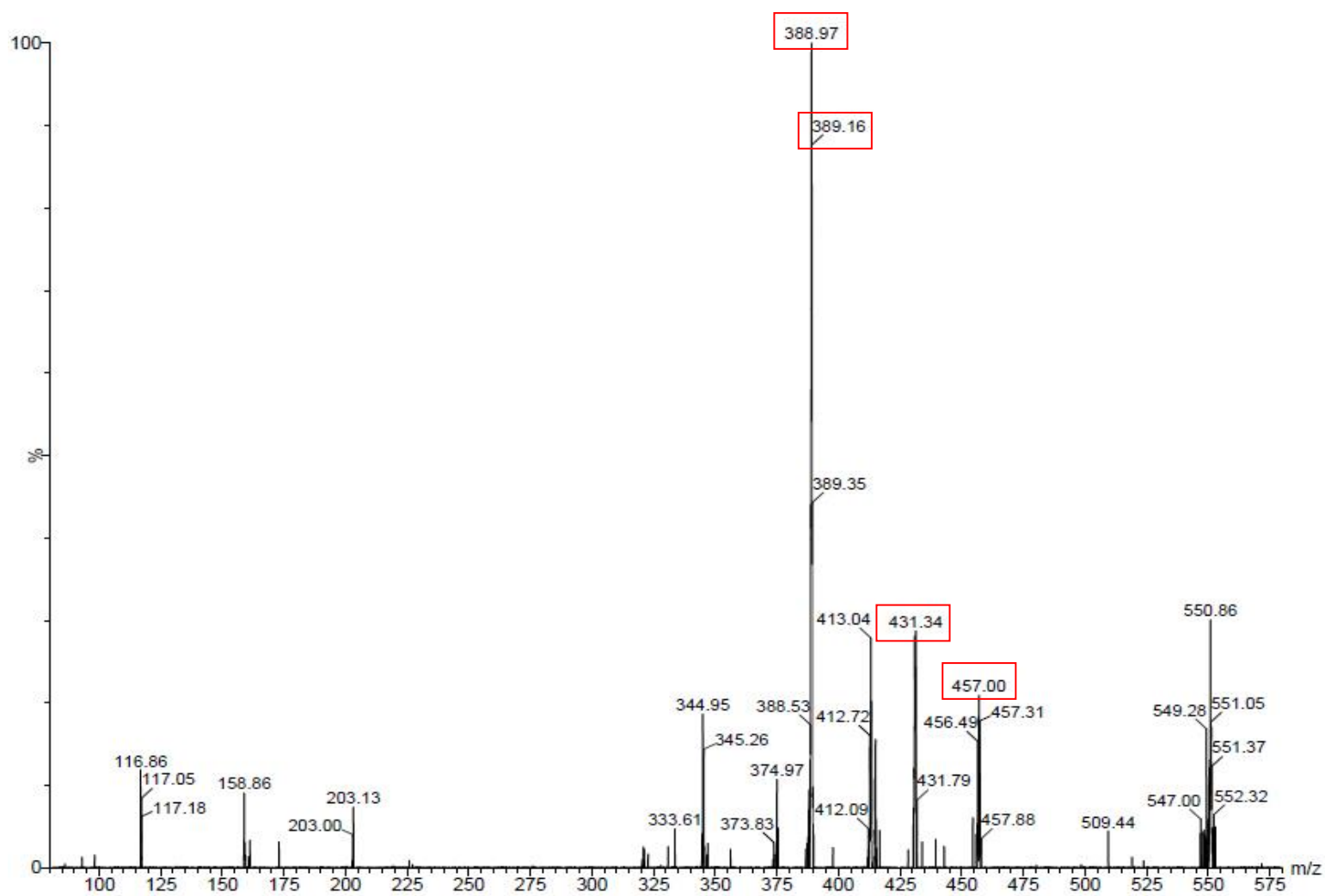
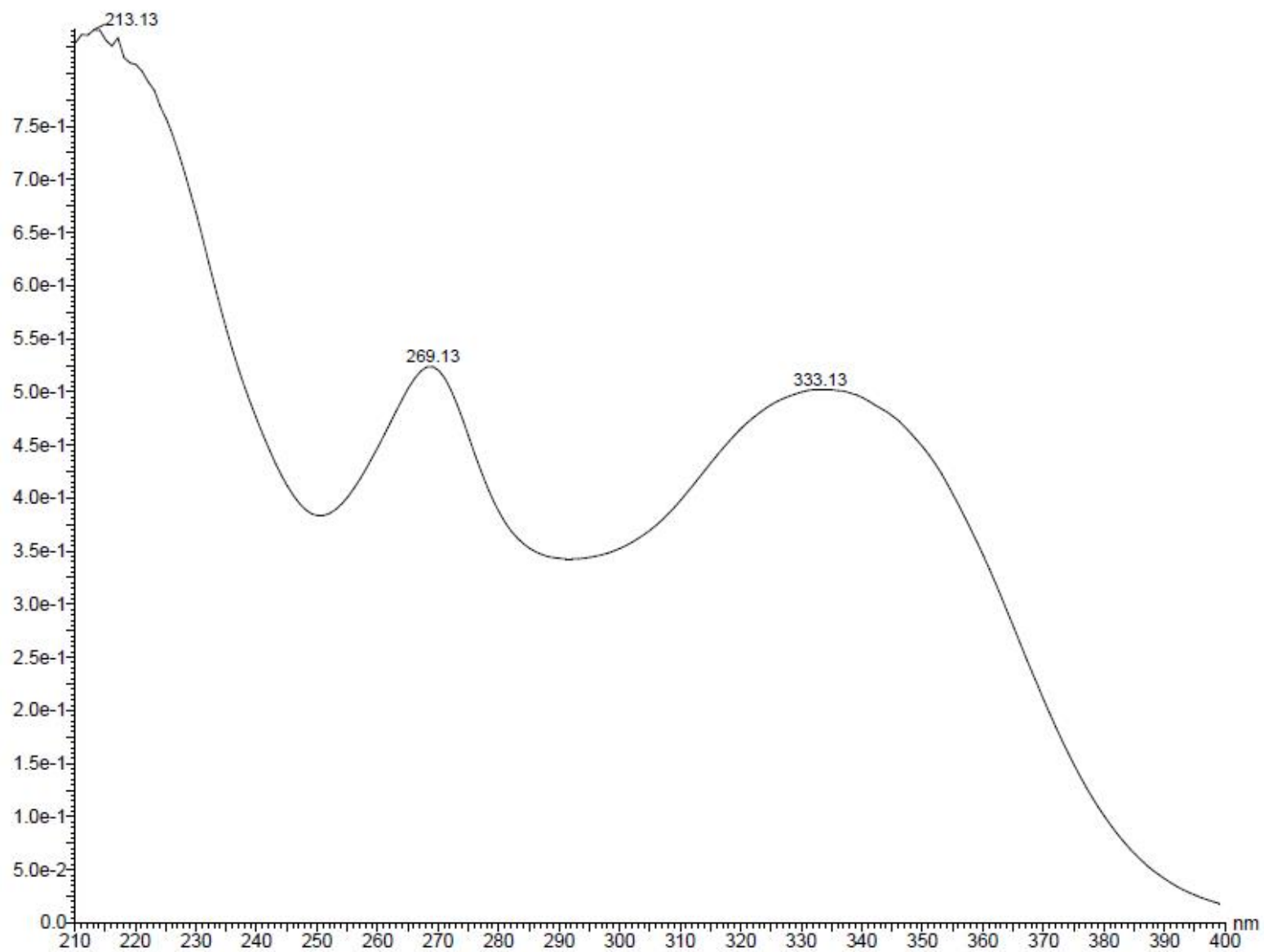


Figura 42: Espectro no ultravioleta da substância com T_R 5,8min presente no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* relacionado ao biflavonoide 7-O-metilrobustaflavona



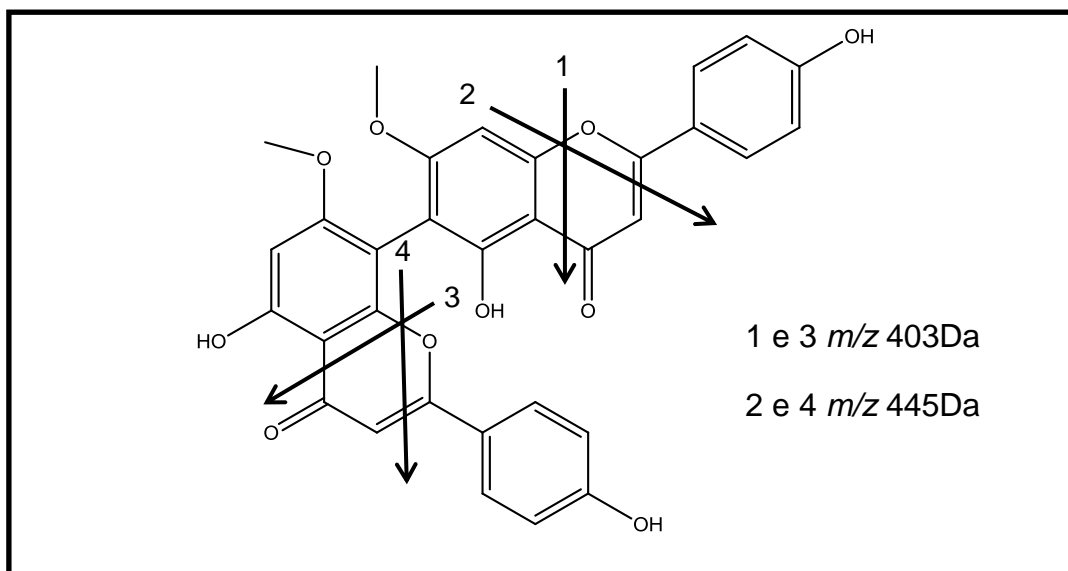
✓ 7,7''-di-O-metilagathisflavona

Nas análises por CLUE do extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* foram detectados dois isômeros em 6.3 e 7.2 min cujas absorções no ultravioleta produziram bandas com λ_{\max} de 270 e 330nm em ambos os isômeros (Figura 39), próximas das absorções esperadas para biflavonas e das absorções observadas na literatura para a biflavona 7,7''-di-O-metilagathisflavona (FELÍCIO *et al*, 1995; MABRY *et al*, 1970; ZHANG *et al*, 2011).

Nas análises do espectro de massas, ambos os isômeros apresentaram moléculas desprotonadas com m/z 565Da (Figura 38), sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular 566Da. Nas análises de fragmentações foram observados fragmentos que corroboram com as propostas de quebras como mostrado na figura 43. As análises dos dados obtidos no presente estudo juntamente com dados da literatura permitiram sugerir que um dos isômeros possui estrutura da 7,7''-di-O-metilagathisflavona. Este flavonoide já foi isolado de extratos da espécie *Ouratea spectabilis* e *Ouratea parviflora* (FELÍCIO *et al*, 1995; GONÇALEZ *et al*, 2001).

A molécula com 565Da a qual sugere se tratar do biflavonoide 7,7''-di-O-metilagathisflavona foi detectada no extrato etanólico das folhas de *Ouratea castaneifolia* e até o presente momento não existe relato desta biflavona na literatura científica nesta espécie. Portanto, este é o primeiro trabalho a sugerir sua presença em *Ouratea castaneifolia*.

Figura 43: Proposta de fragmentações da 7,7''-di-O-metilagathisflavona

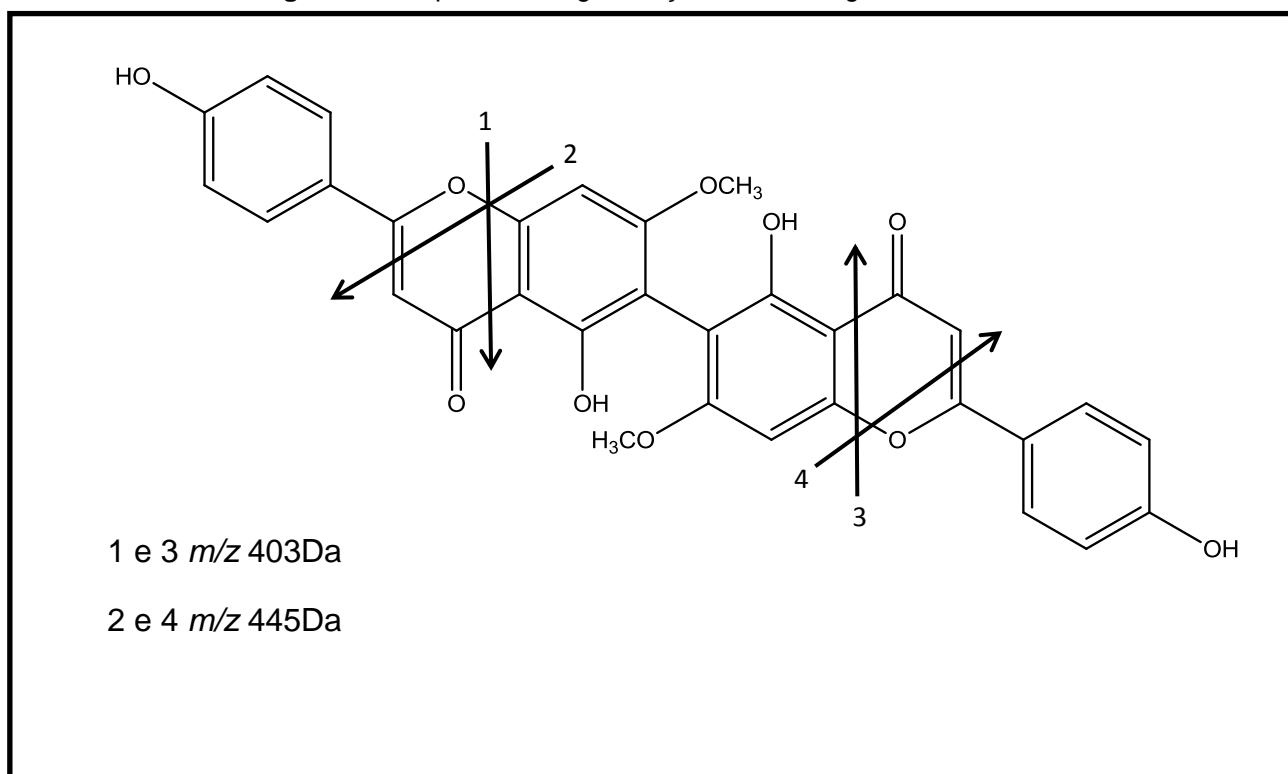


✓ 6,6''-bigenkwanina

Na análise por CLUE foram detectados dois isômeros com T_R de 6,3 e 7,2 min cujas absorções no ultravioleta produziram as bandas com λ_{max} 270 e 330nm em ambos os isômeros (Figura 39), muito próximas das absorções descritas na literatura para a 6,6''-bigenkwanina e a esperada para biflavona (MABRY *et al*, 1970; ZHANG *et al*, 2011).

Nas análises por espectrometria de massa por ESI no modo negativo, ambos os isômeros apresentaram espécie desprotonada m/z 565Da (Figura 38), sugerindo tratar-se de molécula com massa molecular de 565Da . Nas análises de fragmentações foram observados fragmentos que corroboram com as propostas de fragmentações como mostrado na figura 44. As análises dos dados obtidos no presente estudo juntamente com dados da literatura permitiram sugerir que um dos isômeros possui estrutura da 6,6''-bigenkwanina, porém não é possível identificar qual dos dois isômeros se trata esta molécula. Felício *et al* em 1995 detectou esta biflavona na espécie *Ouratea spectabilis*. O presente estudo detectou a proposta molécula em *Ouratea spectabilis* e *Ouratea castaneifolia*. Não há na literatura científica a identificação desta molécula em *Ouratea castaneifolia*, sendo este o primeiro estudo a identificá-la nesta espécie.

Figura 44: Proposta de fragmentações da 6,6''-bigenkwanina



5.7 Substâncias detectadas nas frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano do extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*

Analisou-se as frações 29 a 35, obtidas pela cromatografia em coluna em sílica gel da fração diclorometano de *Ouratea castaneifolia* (item 5.2), com o objetivo de avaliar suas composições químicas. Realizaram-se análises por CLUE-UV-EM das mesmas. As frações 31, 32 e 33 foram solubilizadas em solução DCM:AcOEt(9:1) e separou-se a fração solúvel com o propósito de eliminar o excesso de clorofila. O mesmo foi feito com a fração 34 (Tabela 7).

Tabela 7: Compostos majoritariamente identificados nas frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel

Fração	[M - H] ⁻ (m/z)	Composto
29	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
	565	7'',4'''-di-O-metilamentoflavona / 7,7''-di-O-metilamentoflavona / 7,4'''-di-O-metil-lanaraflavona / 7,7''-di-Ometilagathisflavona / 6,6-bigenkwanina
30	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
	385	3',6,8-tricloro-4',5-dihidroxi-7-metoxi-isoflavona*
	269	Apigenina*
	431	3',5',6,8-tetracloro-4',5-dihidroxi-7-Metoxi-isoflavona*
	419	
31-33 Solúvel	593	4',4''',7,7''-tetra-O-metil-amentoflavona

	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
32	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
33	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
34	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
34 Solúvel	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona
35	537	Lanaraflavona/Hinokiflavona/Amentoflavona
	551	7-O-metilrobustaflavona

*Compostos que provavelmente estão presentes na fração em questão.

Os resultados obtidos das análises cromatográficas das frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da porção diclorometano do extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* permitiram a identificação de espécies desprotonadas que possivelmente se trata das substâncias apigenina, 3',6,8-trichloro-4',5-dihydroxy-7-metoxi-isoflavona e 3',5',6,8-tetracloro-4',5-diidroxio-7-metoxi-isoflavona como constituintes da fração 30. Estas substâncias foram identificadas anteriormente como constituintes de extratos das espécies *Ouratea parviflora* e *Ouratea semiserrata* (ARAÚJO *et al*, 2011; VELANDIA *et al*, 1998). Não é possível confirmar se realmente se tratam dessas moléculas pois não há espectro MS²-ESI⁻ para essas espécies desprotonadas detectadas.

A detecção destas moléculas somente após o fracionamento é possivelmente explicado por estarem mais concentradas na fração que no extrato etanólico bruto, podendo então ser melhor detectada por CLUE-FR-DAD-EM.

5.8 Proantocianidinas

Além dos flavonoides (flavonas, flavonol e biflavonoides) detectados no extratos etanólicos das espécies vegetais deste estudo, as análises por espectrometria de segunda ordem (EM²) permitiram a identificação de quatro proantocianidinas. A seguir estão descritos o detalhamento da identificação de cada substância. Para identificação e caracterização das proantocianidinas os seguintes pontos foram considerados: espectro no UV a 280 nm (λ_{\max}), moléculas desprotonadas [M-H]⁻ e via de fragmentação tipo fissão de anel heterocíclico (HRF, “heterocyclic ring fission”) e fragmentação tipo retro-Diels-Alder (RDA), que fornecem informações sobre a hidroxilação dos anéis B e ligações entre duas unidades monoméricas. Adicionalmente, observou-se a ocorrência da fragmentação nomeada quinonemetideo (QM) que define a posição de ligação entre as duas unidades monoméricas, especialmente a unidade base (LI e DEINZER, 2007).

Proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol. Possui atividade descrita na literatura como bactericida e fungicida. Possuem esta nomenclatura por apresentarem pigmentação vermelha da classe das antocianidinas (HEIL *et al*, 2002; SIMÕES, 2001). Proantocianidinas foram descritas na literatura como compostos encontrados em *Ouratea semiserrata* (CÔRTEZ *et al*, 2002).

✓ (epi)-catequina

Nas análises por CLUE do extrato etanólico dos caules de *Ouratea semiserrata*, foi observada a presença de uma substância com T_R de 2,17 min. Os espectro de absorção no UV da substância indica se tratar de tanino, já que possui banda com máximo de absorção próximo 280 nm (Figura 45). No espectro de massa ESI no modo negativo, foi possível observar a molécula

desprotonada com m/z 289Da (Figura 45), sugerindo então tratar-se de uma molécula com massa molecular de 290Da.

Nas análises por EM² (Figura 46) podemos observar os fragmentos de m/z 151 e 137Da referentes a quebra tipo RDA. Já os fragmentos 165 e 123Da podem ser atribuídos a fragmentação quinonemetideo.

Figura 45: Estrutura molecular, espectro no UV e espectro de massa ESI⁻ para a substância de MM 290Da presente no extrato etanólico de caule de *Ouratea semisserrata*

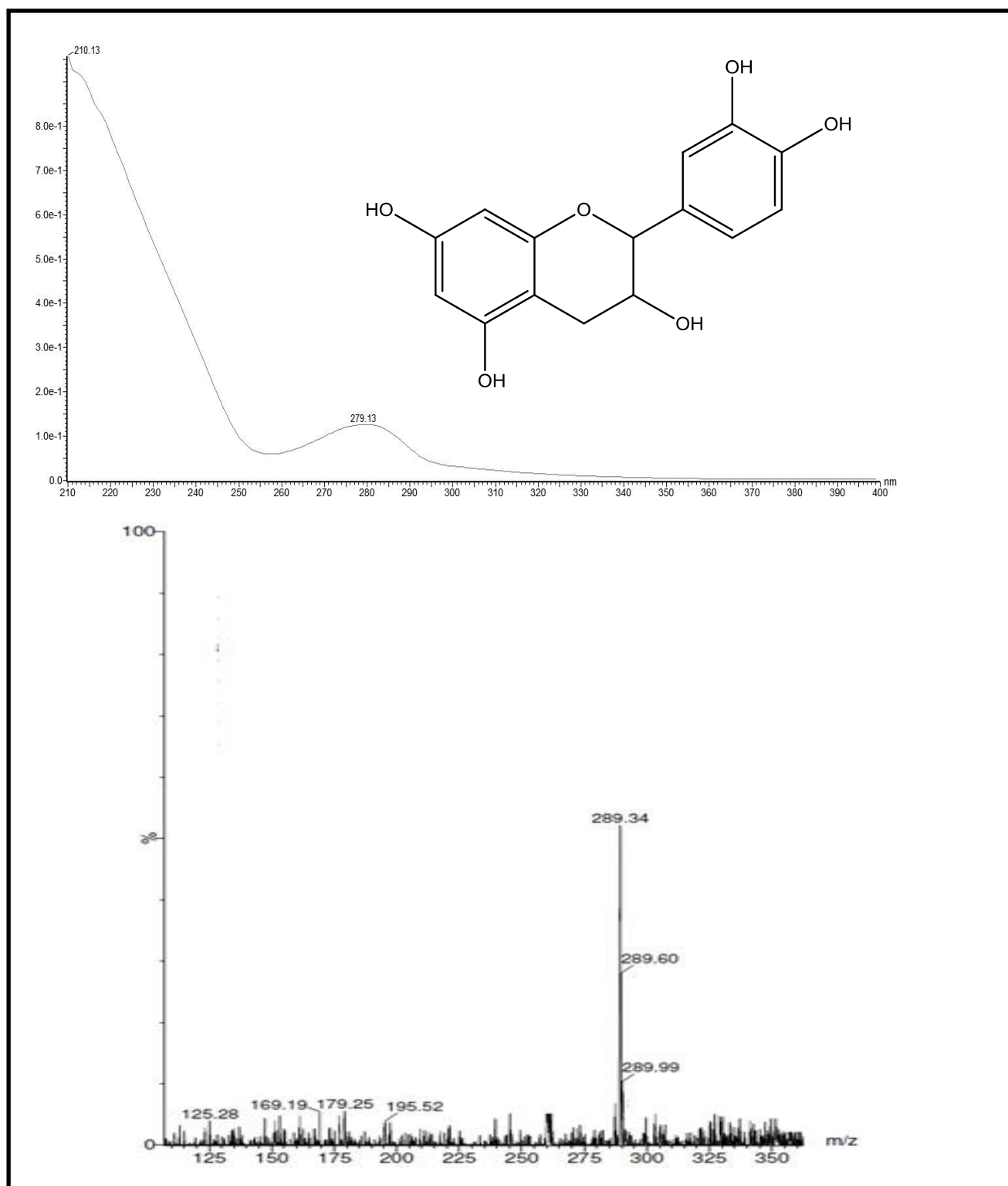
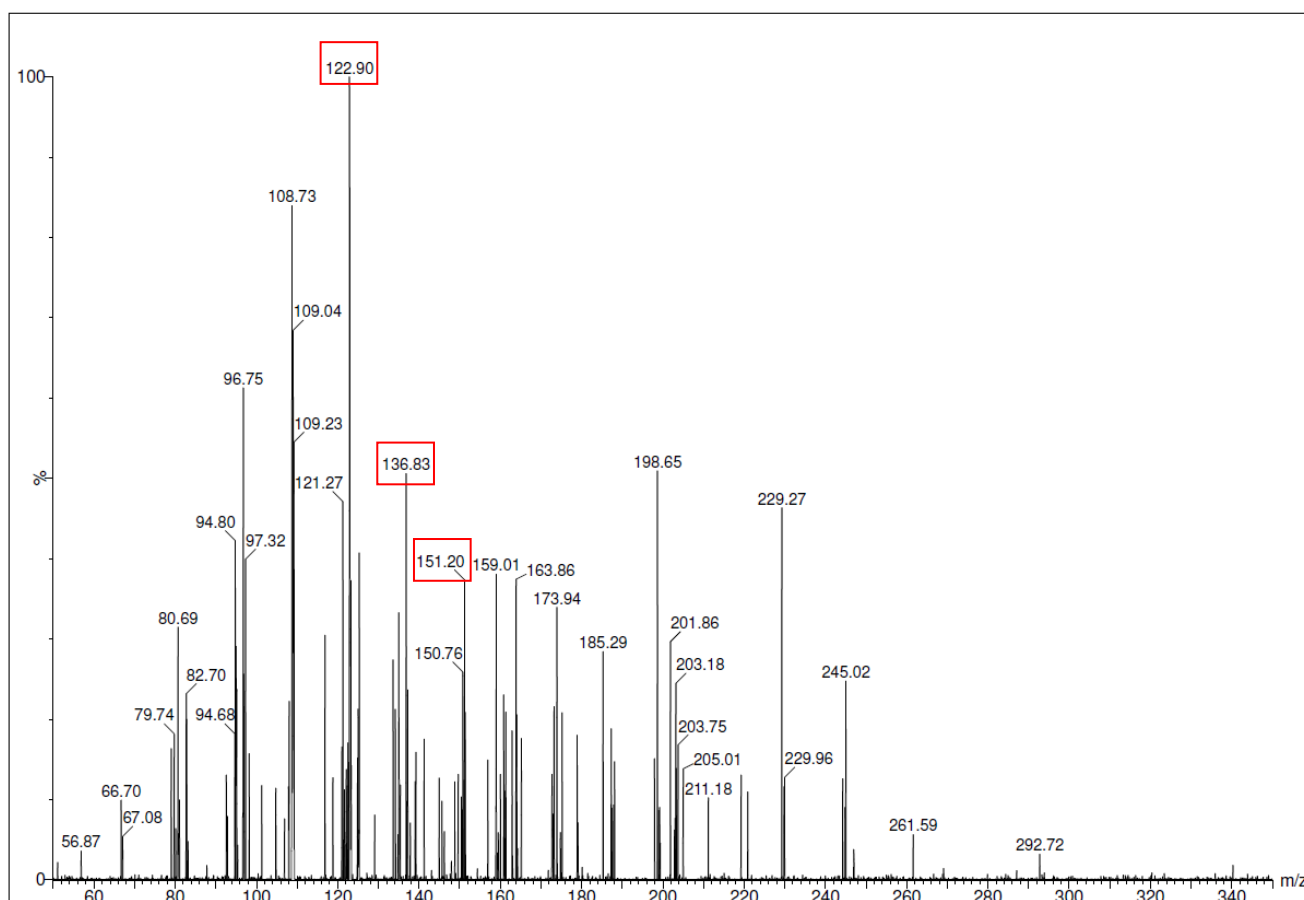


Figura 46: Espectro de massa EM²-ESI⁻ para a substância de MM 290Da presente no extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata*.



✓ Caracterização dos isômeros (epi)-catequina-(epi)-catequina

A análise por espectro UV apresentou banda de absorção próximo de 280nm, o esperado para taninos. Dois isômeros com m/z 577Da foram detectados por espectroscopia de massa modo ESI negativo e foram atribuídos como sendo dímeros de proantocianidina do tipo B (epi)catequina-(epi)catequina (Figura 47). Teoricamente, 16 proantocianidinas diméricas são possivelmente derivadas de catequina e epicatequina. No entanto, Scalbert provou que apenas compostos com uma estereoquímica 3,4-trans ocorrem naturalmente, reduzindo assim o número teoricamente possível de compostos para oito. (SANTOS-BUELGA e SCALBERT, 2000). As fragmentações dos dois isômeros produziram o pico de base com m/z de 289Da [(M-H) - 288 Da] pela quebra tipo QM. No espectro de massas (Figura 48 e 49) as duas substâncias

apresentaram fragmentos secundários de m/z 125Da originários de fragmentação HRF e m/z 407Da [(M-H) -170 Da] pela perda de um fragmento RDA (152 Da) seguido pela perda de uma molécula de água (18Da). Adicionalmente o isômero com T_R de 1.89min apresenta os fragmentos de m/z 435 e 451Da originários de quebras secundárias tipo RDA e HRF, respectivamente. A molécula proposta foi detectada nos extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*.

Figura 47: Estrutura molecular de proantocianidina B detectada em extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*

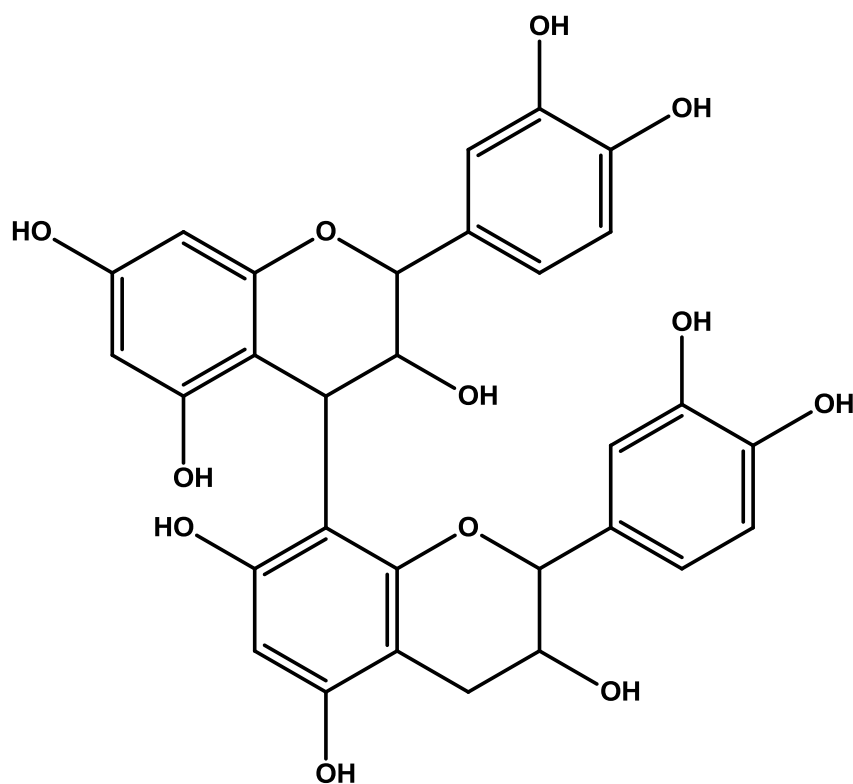


Figura 48: Proposta de fragmentação para os isômeros de MM 578Da presente no extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*

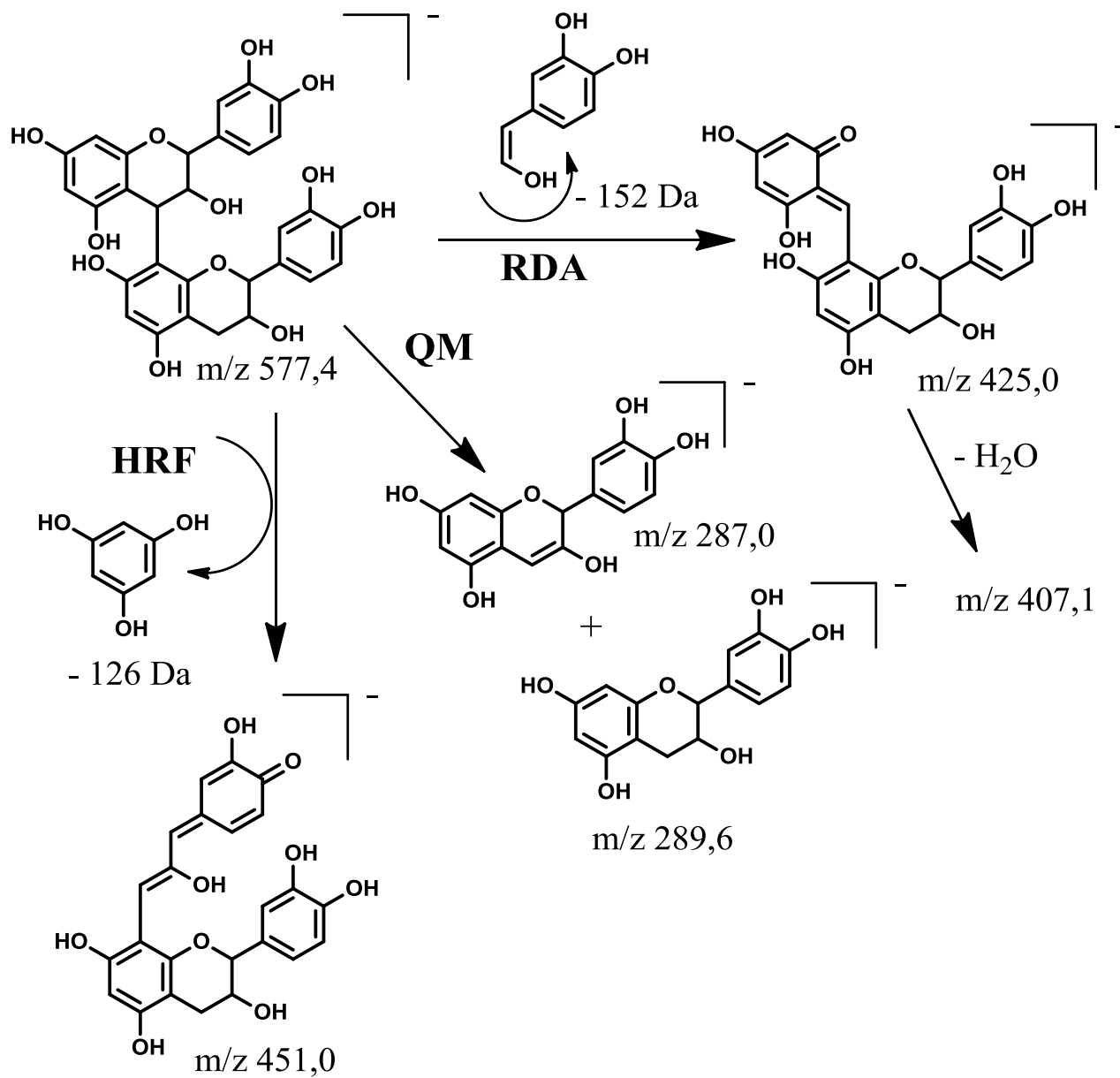
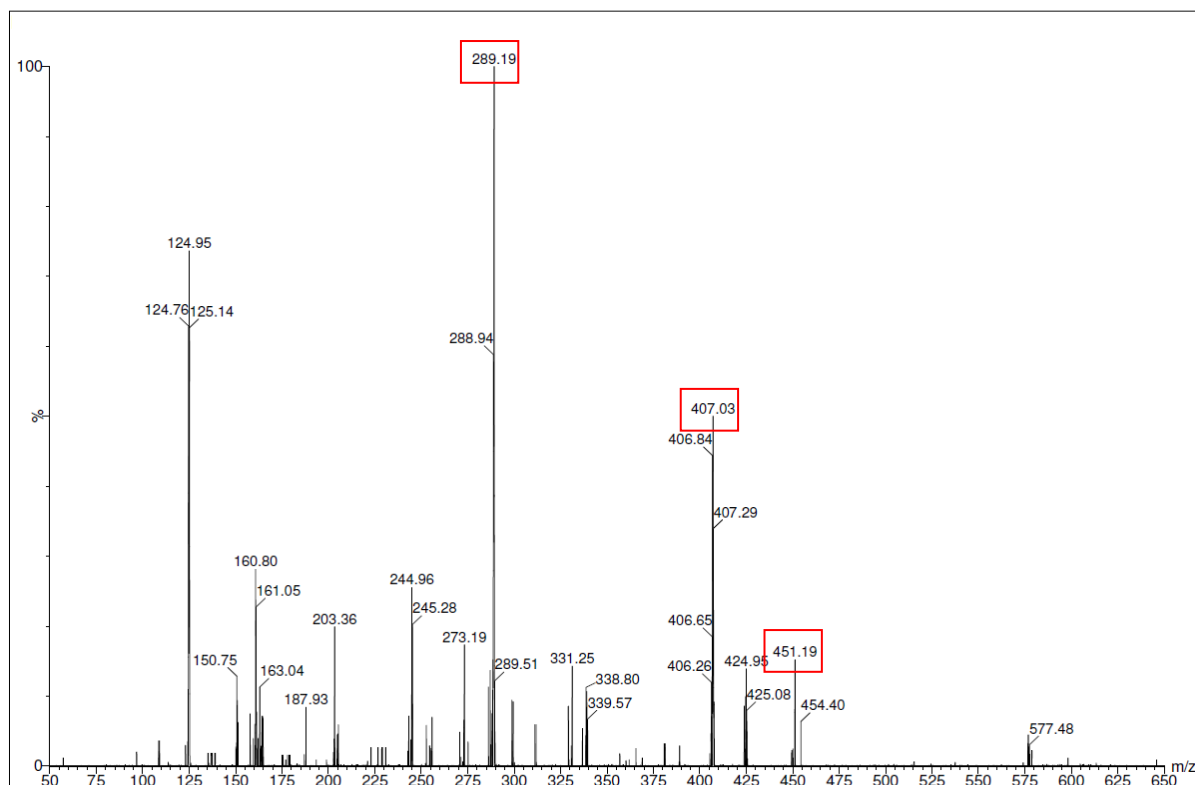
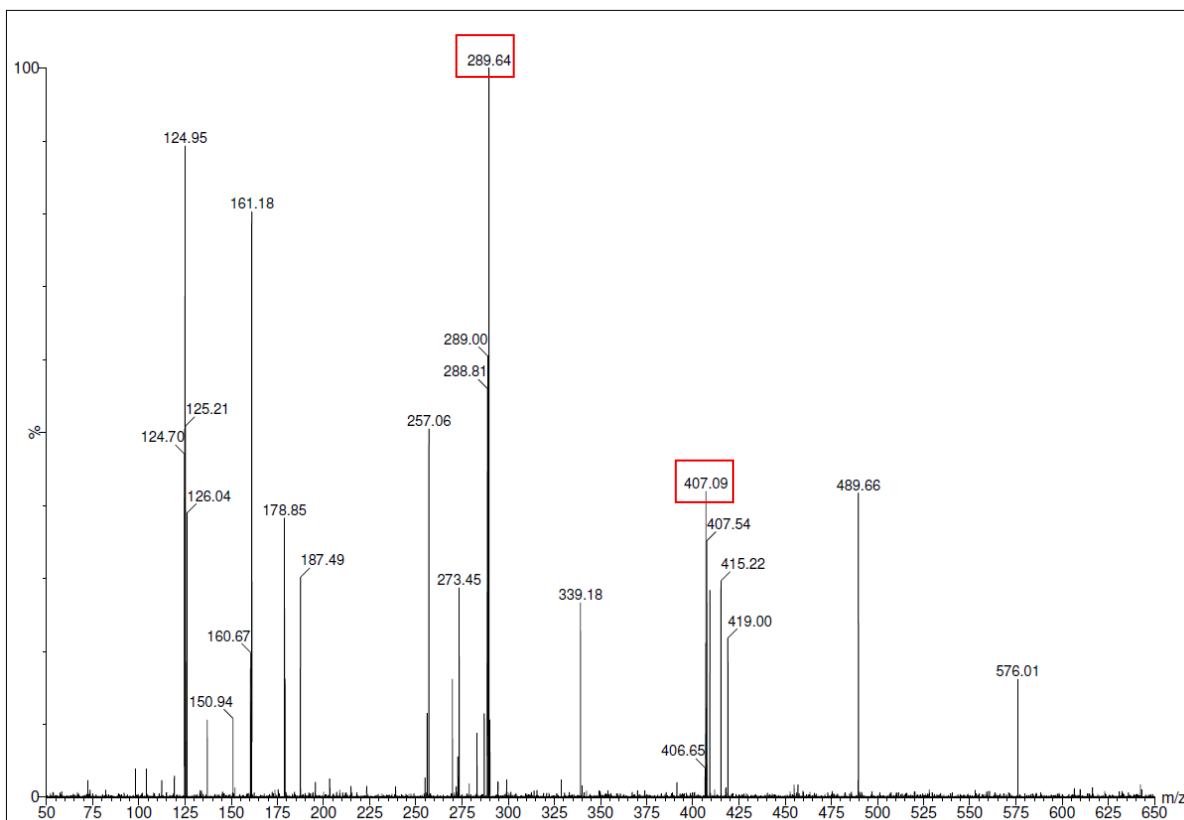


Figura 49: Espectro de massa EM²-ESI⁻ dos isômeros de MM 577Da presente no extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*



✓ **Caracterização dos isômeros (epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina**

Três isômeros foram detectados com espécie desprotonada m/z 865Da no modo ESI negativo, sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular de 866Da. Foram atribuídos a uma proantocianidina [(epi) catequina-(4,8 /)-(epi) catequina- (4,8 /)-(epi)-catequina-(4,8)-(epi)-catequina]. As análises por EM² do isômero com T_R 1,85 min (**A**) forneceram como principais picos os íons fragmentos de m/z 739, 621, 577, 575, 287, 125Da (Figura 50 e 51). O pico base com m/z 621Da é referente a quebra no anel C da unidade oligomérica 1. Os fragmentos de m/z 739 e 125Da são referentes à quebra HRF enquanto os fragmentos de m/z 577, 575 e 287Da tiveram origem em quebras tipo QM. O isômero com T_R de 2,15 min (**B**) tem como pico base o fragmento de m/z 425Da atribuído a quebra tipo QM entre as unidade 2 e 3 seguido de uma quebra RDA na unidade 2. Vários outros fragmentos foram produzidos destacando os com m/z de 713, 695, 577, 287 e 125Da que podem ser atribuídos a quebras tipo RDA m/z 713Da [(M-H) -152 Da], quebras tipo RDA seguido de uma desidratação m/z 695Da [(M-H) -170 Da], quebras tipo QM íons fragmentos m/z 577 e 287 Da; e finalmente quebra HRF com fragmento de m/z 125Da. O terceiro isômero com T_R de 2,28 min (**C**) apresentou íons fragmentos semelhantes ao isômero 2 (T_R 2,15 min) nota-se diferenças no pico base com m/z 423 Da. Além disso, o isômero 3 apresenta um fragmento de m/z 739Da que está ausente no isômero 2. As análises do presente trabalho e dados da literatura permitiram sugerir tratar-se de isômeros da (epi) catequina-trímeros do tipo B. As propostas de fragmentações estão descritas na Figura 52.

A análise no espectro UV apresentou banda de absorção de 279nm, muito próximo da esperada para taninos (aproximadamente 280nm). Esta molécula foi identificada no extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*.

Figura 50: Espectro de massa EM²-ESI⁻ dos isômeros de MM 865Da presente no extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*

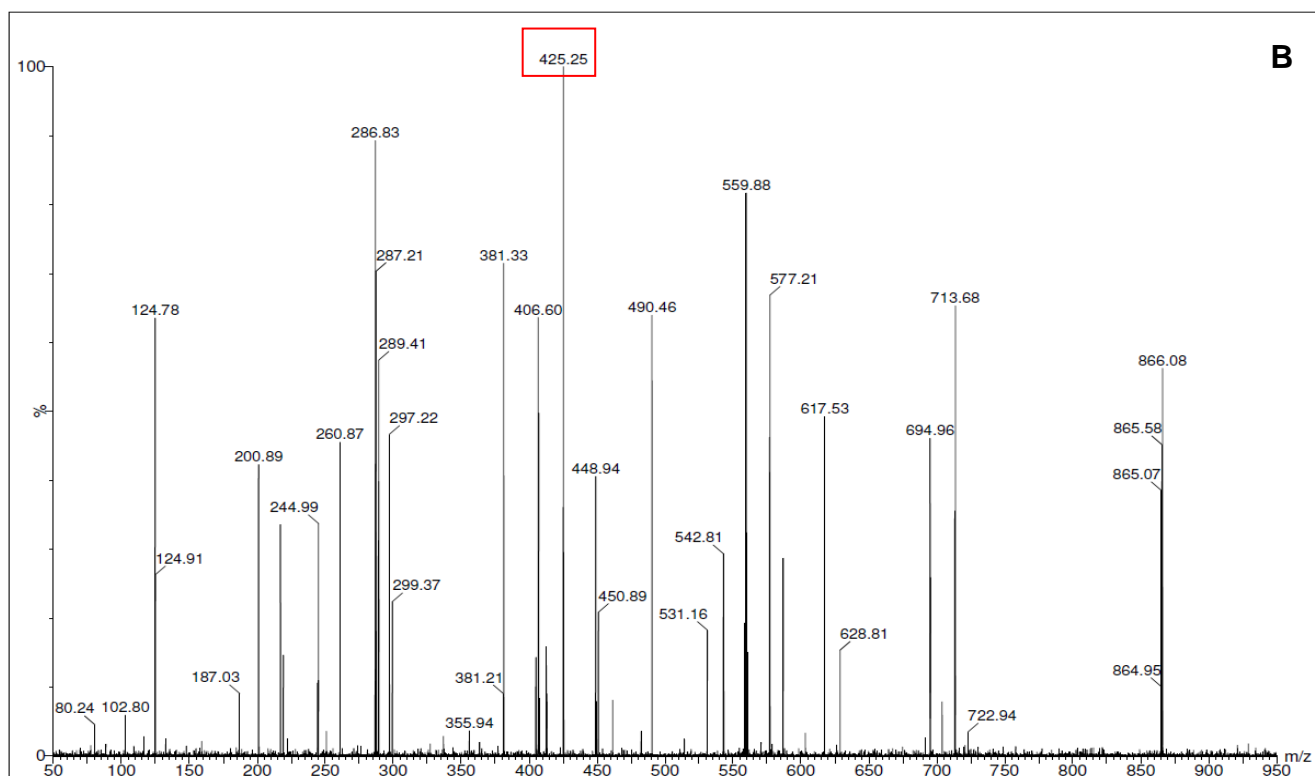
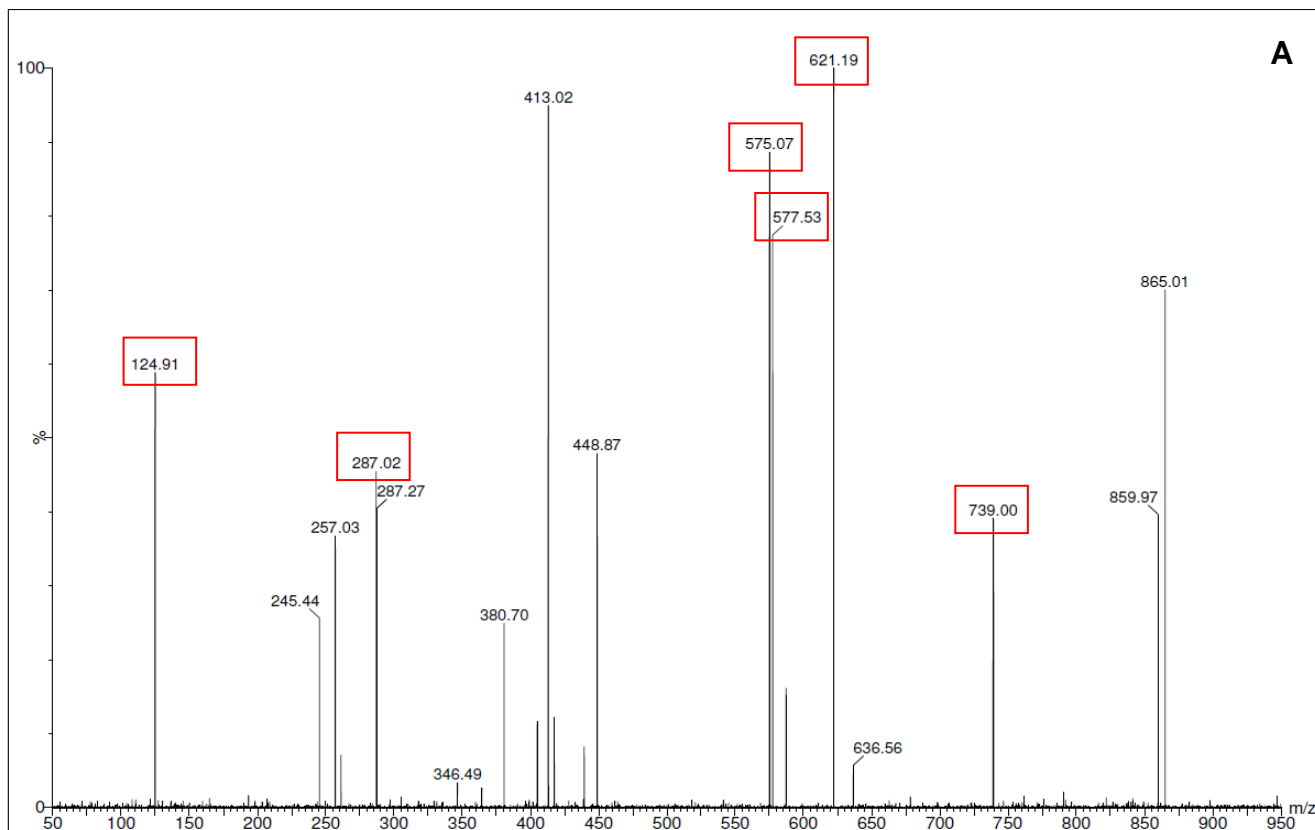


Figura 51: Espectro de massa EM²-ESI⁻ dos isômeros de MM 865Da presente no extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata*

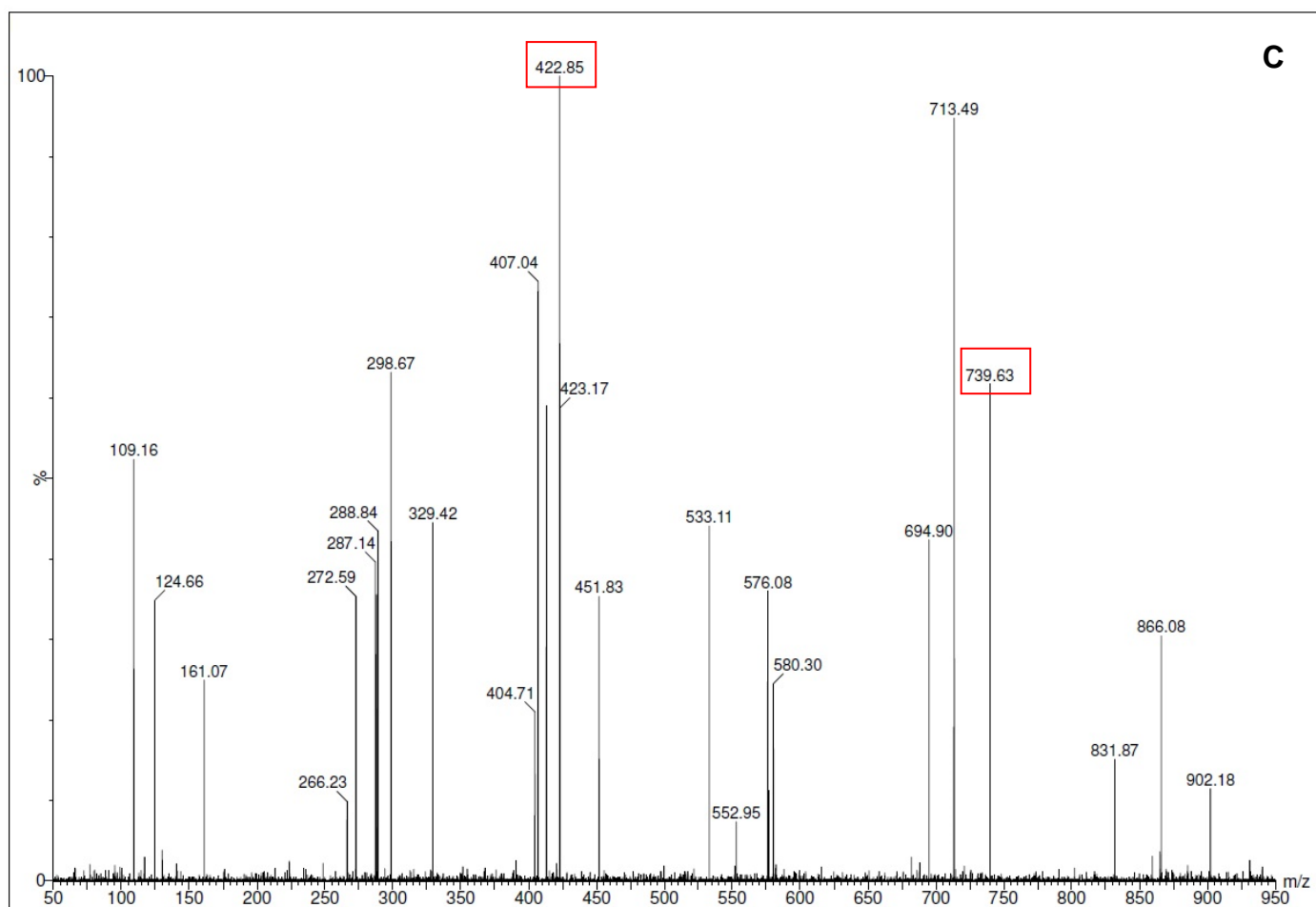
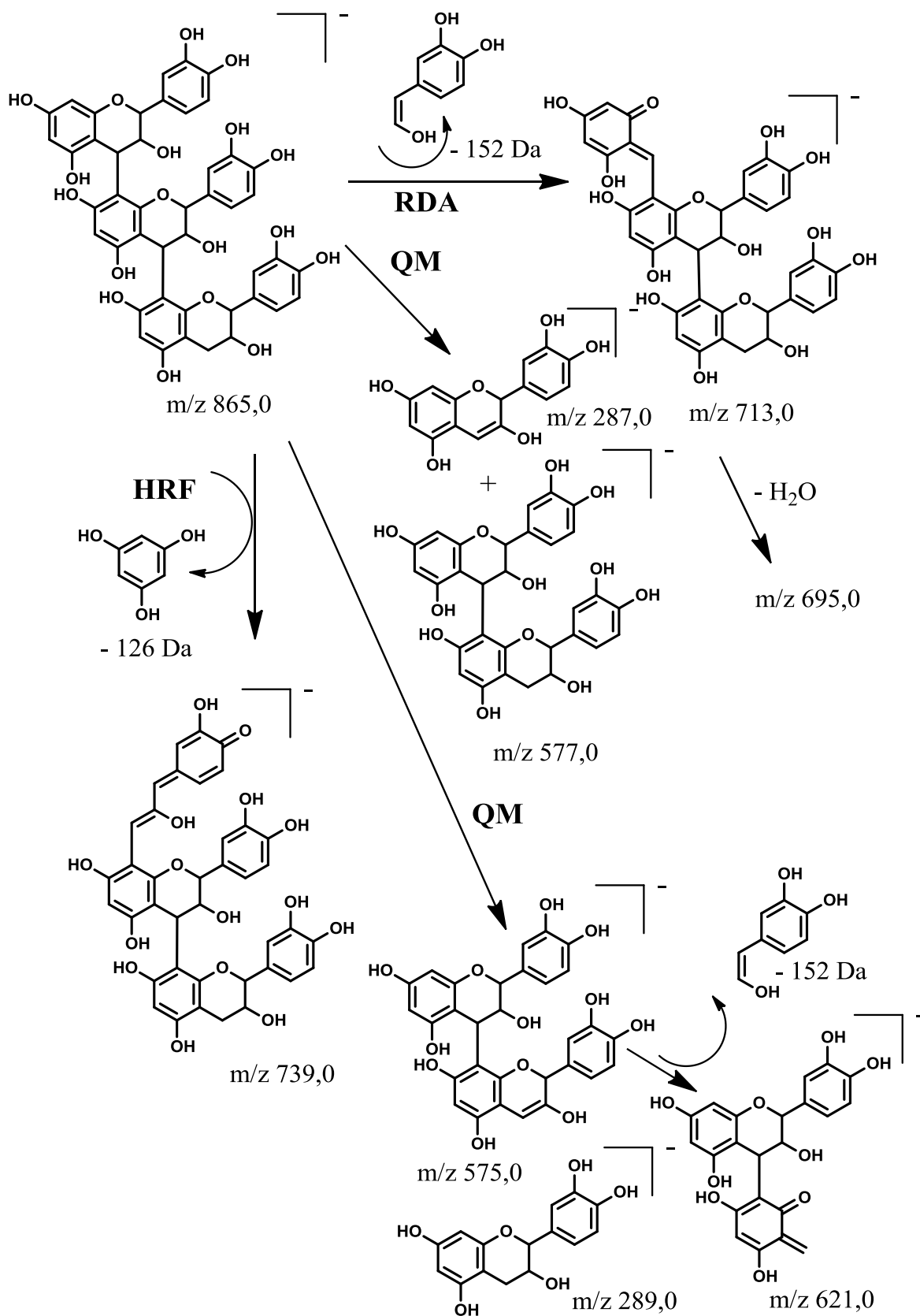


Figura 52: Proposta de fragmentação para os isômeros de MM 866Da presente no extrato etanólico de caule de *Ouratea semisserrata*



✓ **Caracterização da (epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina-(epi)-catequina (MM 1154 Da)**

No tempo de T_R 1,85 min foi observado uma substância que apresentou uma molécula desprotonada de m/z 1153Da, sugerindo tratar-se de uma molécula com massa molecular de 1154Da. Observou-se espectro de UV característico de tanino, com absorção próximo de 280nm. Nas análises por EM^2 (Figura 53) podemos observar o pico base de m/z 863Da atribuído a uma quebra tipo QM. Outros fragmentos secundários também são observados destacando-se os de m/z 723, 575 e 449Da que podem ser relacionadas a fragmentações secundárias tipo QM, RDA e HRF característicos de quebras em proantocianidinas poliméricas. As propostas de fragmentações estão descritas na Figura 54.

As análises do presente trabalho e dados da literatura permitiram sugerir tratar-se de um tetrâmero de proantocianidina do tipo B (JAISWAL *et al.*, 2012). A molécula proposta foi detectada em extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata*.

Figura 53: Espectro de massa EM^2 -ESI⁻ da substância de MM 1154Da presente no extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata*

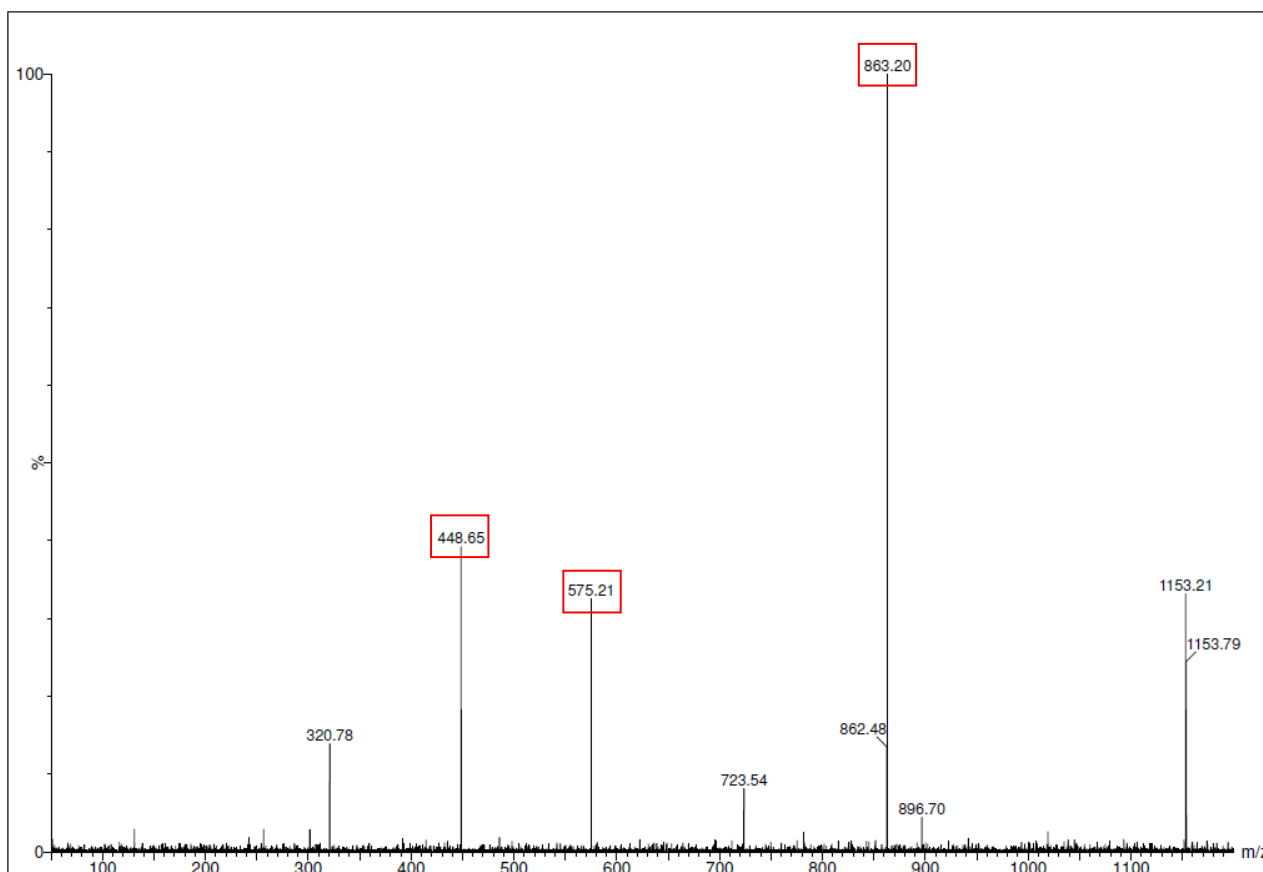
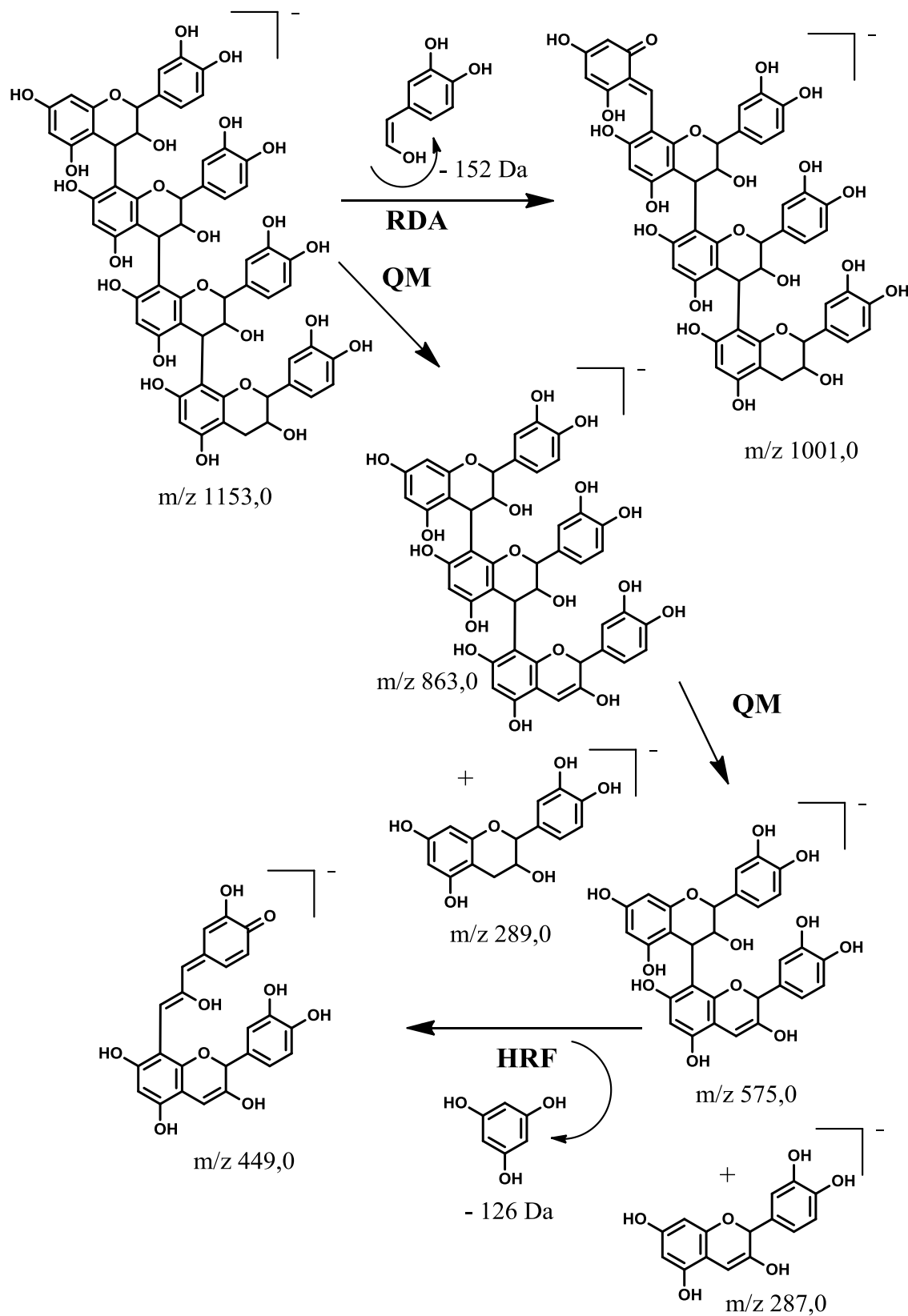


Figura 54: Proposta de fragmentação para a substância de MM 1154 Da presente no extrato etanólico de caules de *Ouratea semiserrata*



5.9 Ensaio de citotoxicidade pelo método colorimétrico do MTT

O ensaio colorimétrico do MTT baseia-se na capacidade da mitocôndria de células viáveis em clivar o sal de tetrazólio (MTT), o brometo de 3-(4",5"-dimetiltiazol-2"-ila)-2,5-difeniltetrazol em formazana, através da enzima succinato desidrogenase. O sal de tetrazólio é hidrossolúvel e possui coloração amarela, já a formazana é um precipitado insolúvel em meio aquoso e possui coloração azul-violeta (DENIZOT e LANG, 1986; MOSMANN, 1983; TWENTYMAN e LUSCOMBE, 1987). A atividade citotóxica de um composto avalia o grau de morte celular que este composto pode causar em uma cultura específica de linhagem celular

Realizou-se o teste de citotoxicidade através do ensaio colorimétrico do MTT para obter os valores de CC_{50} , que se trata da concentração em que o composto testado apresenta citotoxicidade em 50% das células testadas. Realizaram-se os ensaios em linhagens Vero (rim de *Cercopithecus aethiops*). Utilizou-se linhagem celular Vero por ser uma linhagem susceptível a uma ampla gama de vírus e por isso são comumente utilizadas em laboratórios de virologia. Instituições de referências na área, como a *Public Health England's European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), consideram a linhagem Vero adequada para a cultura de ZIKV (*Public Health England*, 2018).

Os testes foram realizados com os extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia*, folhas de *Ouratea spectabilis* e galhos de *Ouratea semiserrata*. Também foram testadas as frações obtidas por partição líquido-líquido dos extratos etanólicos das folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* e as frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração DCM de *Ouratea castaneifolia*. Os resultados de CC_{50} variaram de 12,7 μ g/mL a 420,6 μ g/mL para cada amostra, descritos na Tabela 8 e 9. A avaliação da citotoxicidade da podofilotoxina a uma concentração de 25 μ g/mL foi utilizada como controle positivo deste estudo, apresentando CC_{50} de 1,34 μ g/mL \pm 0,1704. A Podofilotoxina apresenta na literatura alta atividade citotóxica através de sua ligação à tubulina, subunidade monomérica fundamental dos microtúbulos, componente essencial do citoesqueleto celular em células eucarióticas. A ligação à tubulina causa um desequilíbrio nos microtúbulos,

causando assim uma atividade antimitótica e consequente morte celular (MEDRADO *et al*, 2015)

Os extratos etanólicos brutos e suas frações obtidas por partição líquido-líquido foram solubilizados em DMSO na concentração de 20mg/mL. As frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano do extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* foram solubilizadas em DMSO na concentração de 5mg/mL.

Em relação à espécie *Ouratea castaneifolia*, comparando o extrato etanólico das folhas com as frações obtidas por partição líquido-líquido nos três solventes mostrados na Tabela 8, observa-se que a fração DCM apresentou uma citotoxicidade elevada em relação ao extratos etanólico das folhas. A fração aquosa e AcOEt de *Ouratea castaneifolia* apresentou menor citotoxicidade comparada ao extrato etanólico bruto das folhas.

O extrato etanólico de folhas da espécie vegetal *Ouratea spectabilis* mostrou-se mais citotóxico comparado com suas frações Aquosa e AcOEt. Já a fração DCM, assim como na *Ouratea castaneifolia*, apresentou uma maior citotoxicidade em relação ao extrato bruto da espécie vegetal, sugerindo que os compostos de média e baixas polaridades presentes na fração DCM possuem uma ação citotóxica maior comparada às demais frações obtidas após a partição.

O extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata* foi a espécie vegetal que apresentou maior citotoxicidade em relação aos extratos etanólicos das outras espécies testadas.

Tabela 8: Valores de CC₅₀ calculados através do ensaio colorimétrico do MTT para cada extrato e suas partições

VALORES DE CC₅₀ EM LINHAGEM CELULAR VERO	
Composto	CC₅₀ (µg/mL)
<i>O. castaneifolia</i> Folhas	381,7 ±2,73
<i>O. castaneifolia</i> DCM	50,3 ±1,32
<i>O. castaneifolia</i> AcOEt	>400
<i>O. castaneifolia</i> Aquosa	420,6 ±5,83
<i>O. spectabilis</i> Folhas	67,2 ±2,30
<i>O. spectabilis</i> DCM	25,0 ±1,39
<i>O. spectabilis</i> AcOEt	188,8 ±1,48
<i>O. spectabilis</i> Aquosa	282,8 ±3,65
<i>O. semiserrata</i> Caule	47,4 ±1,47
Podofilotoxina	1,34 ±0,1704

Como mostrado no Item 4.8, a fração DCM de folhas de *Ouratea castaneifolia* apresentou, através de cromatografia em camada delgada, maior concentração de flavonoides e em seguida, realizou-se cromatografia em coluna de sílica gel, gerando 42 frações. Entre essas frações, selecionou-se as frações 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35, pois foram as frações que apresentaram maior concentração de flavonoides analisados por cromatografia em camada delgada. As frações 30 a 35, foram solubilizadas em uma solução DCM:AcOEt em uma proporção 9:1 (v/v) com a finalidade de separar as moléculas de clorofila. Foram utilizadas então suas frações solúveis nesta solução e a fração

não solúvel. As frações 31 a 33 foram unidas em uma só (Fração 31-33 Solúvel).

Realizou-se então, a avaliação da citotoxicidade destas frações pelo ensaio colorimétrico do MTT e os valores de CC_{50} estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Valores de CC_{50} calculados através do ensaio colorimétrico do MTT para frações obtidas por cromatografia em coluna de sílica gel da fração diclorometano de *Ouratea Castaneifolia*

VALORES DE CC_{50} EM LINHAGEM CELULAR VERO	
Fração	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Fração 29	30,5 \pm 2,18
Fração 30	29,9 \pm 1,39
Fração 30 Solúvel	12,7 \pm 1,78
Fração 31	15,6 \pm 1,81
Fração 32	33,4 \pm 2,23
Fração 31-33 Solúvel	39,1 \pm 2,25
Fração 35	72,2 \pm 1,72
Fração 35 solúvel	97,9 \pm 1,44
Fração 34 Solúvel	76,3 \pm 1,59
Podofilotoxina	1,34 \pm 0,1704

Observa-se, através dos dados sumarizados nas Tabelas 8 e 9, que as frações obtidas da fração DCM das folhas de *Ouratea castaneifolia*

apresentaram, em sua grande maioria, maior citotoxicidade em relação aos extratos etanólicos brutos das espécies vegetais descritas na Tabela 8. De modo geral, também há uma maior citotoxicidade das frações em relação às partições dos extratos etanólicos brutos. Esta maior citotoxicidade provavelmente está relacionada ao fato dos compostos que causam a citotoxicidade estarem mais concentrados nas frações que em seus extratos brutos e partições.

A obtenção dos valores de CC_{50} dos extratos e suas frações obtidos das espécies vegetais foi utilizada como parâmetro para a triagem antiviral, utilizando-se uma concentração não citotóxica para realizar os testes em linhagem de células Vero infectadas pelo ZIKV.

5.10 Ensaio antiviral

Após a avaliação de citotoxicidade de cada extrato e suas frações, determinaram-se as concentrações não citotóxicas para realizar os testes de atividade antiviral. Os extratos e suas frações foram avaliados pela técnica do MTT frente a células Vero infectadas com ZIKV. Por meio de regressão não linear, calculou-se a Concentração Efetiva a 50% (CE_{50}), ou seja, em qual concentração o extrato ou fração testados protegem 50% das células infectadas pelo ZIKV. Estabeleceu-se, arbitrariamente, no presente estudo, uma classificação dos extratos testados em muito ativos ($CE_{50} < 50\mu\text{g/mL}$), moderadamente ativos ($50 < CE_{50} < 100\mu\text{g/mL}$), pouco ativos ($CE_{50} > 100\mu\text{g/mL}$) e não ativos os extratos ou frações que não protegeram as células do efeito citopático causado pelo ZIKV. A atividade antiviral foi encontrada através da comparação entre as densidades ópticas a 490nm (DO_{490}) como mostrado no item 4.9.10.

No total, avaliou-se a atividade antiviral de 18 extratos/frações, onde sete foram ativos com CE_{50} variando de 35,12 a 312,7 $\mu\text{g/mL}$. Porém, onze extratos/frações não apresentaram inibição do efeito citopático causado pelo ZIKV na linhagem celular Vero. Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Valores de citotoxicidade (Vero) e atividade antiviral de extratos etanólicos de espécies de *Ouratea* e suas partições frente ao ZIKV pela técnica colorimétrica do MTT

Extrato/Fração	CC ₅₀ em VERO 72 horas (µg/mL)	CE ₅₀ em ZIKV 72 horas (µg/mL)	Índice de Seletividade (IS)
<i>O. castaneifolia</i> Folhas	381,7 ±2,73	138,5 ±2,61	2,75
<i>O. castaneifolia</i> DCM	50,3 ±1,32	35,13 ±6,02	1,43
<i>O. castaneifolia</i> AcOEt	>400	312,7 ±2,69	>1,28
<i>O. castaneifolia</i> Aquosa	420,6 ±5,83	224,4 ±4,58	1,87
<i>O. spectabilis</i> Folhas	67,2 ±2,30	NA	-
<i>O. spectabilis</i> DCM	25,0 ±1,39	NA	-
<i>O. spectabilis</i> AcOEt	188,8 ±1,48	NA	-
<i>O. spectabilis</i> Aquosa	205,5 ±3,65	NA	-
<i>O. semiserrata</i> caule	47,4 ±1,47	> 37,5	>1,26

Como observado na Tabela 10, o extrato etanólico das folhas de *Ouratea spectabilis* não apresentou inibição da multiplicação e efeito citopático do ZIKV nas células infectadas. Suas frações AcOEt, DCM e aquosa obtidas por partição também não apresentaram atividade contra o ZIKV.

Em relação à *Ouratea castaneifolia*, o extrato etanólico das folhas apresentou uma CE₅₀ de 138,5µg/mL ±2,61, mostrando ser pouco ativo contra o vírus. As frações obtidas por partição deste mesmo extrato também apresentaram atividade contra o ZIKV. Comparando as três partições, observa-se que as frações AcOEt e Aquosa apresentaram baixa atividade contra o ZIKV, com CE₅₀ de 7 ±2,69 e 224,4 ±4,58 µg/mL, respectivamente. Porém, houve uma maior atividade antiviral na fração DCM, apresentando uma CE₅₀ de 35,13 ±6,02 µg/mL, mostrando ser muito ativo ao efeito citopático do ZIKV. O fato da fração DCM ter apresentado maior atividade em relação às outras frações e ao próprio extrato etanólico bruto da espécie de origem, indica que as moléculas responsáveis pelo efeito antiviral possuem média e baixa polaridade. As análises por CCD mostrou uma maior concentração de flavonoides na porção DCM, sugerindo-se então que esta classe de metabólitos está

relacionada ao efeito antiviral nesta espécie, o que corrobora com o a literatura científica que aborda a atividade antiviral de diversos tipos de flavonoides.

O extrato de caule de *Ouratea semiserrata* mostrou-se muito ativo com uma $CE_{50} > 37,5 \mu\text{g/mL}$ frente ao ZIKV. Comparando os extratos etanólicos das três espécies deste estudo, observa-se que, com exceção da *Ouratea spectabilis*, os extratos das espécies apresentaram uma alta inibição do efeito citopático do ZIKV em células Vero, o que torna estas espécies uma potencial fonte de produtos naturais com atividade contra ZIKV que podem ser isolados e testados.

Um estudo publicado em 2011 por Brandão *et al* demonstrou a ação antiviral das espécies *Ouratea semiserrata* e *Ouratea castaneifolia* também utilizando ensaio colorimétrico do MTT. A espécie *Ouratea semiserrata* apresentou CE_{50} de 8.4 ± 0.7 , 9.2 ± 0.8 e 254.4 ± 10.7 para *Herpes vírus tipo 1* (HSV-1), *Vaccinia virus* (VACV) e *Encefalomiocardite murina virus* (EMCV) respectivamente. Já a *Ouratea castaneifolia* apresentou CE_{50} de 56.5 ± 3.2 , 39.6 ± 1.3 , 465.7 ± 32.5 para *Herpes vírus tipo 1* (HSV-1), *Vaccinia virus* (VACV) e *Encefalomiocardite murina virus* (EMCV) respectivamente.

Araújo *et al* em 2011 testou atividade inibitória de dois biflavonoides isolados de *Ouratea parviflora* (Agathisflavona e 7''-metil-agathisflavona) frente ao *Herpes vírus 1* e *Herpes vírus 2* (HSV-1 e HSV-2). A agathisflavona a uma concentração de $15,6 \mu\text{g/mL}$ apresentou uma porcentagem de inibição de 94,4 e 85,9% contra HSV-1 e HSV-2 respectivamente. A 7''-metil-agathisflavona a uma concentração de $31,2 \mu\text{g/mL}$ apresentou uma porcentagem de inibição de 82,2 e 95,5% contra HSV-1 e HSV-2 respectivamente.

Como mostrado no item 5.6.2.2, detectou-se no extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia* a presença do biflavonoide 7,7''-di-O-metilagathisflavona, estruturalmente semelhante aos biflavonoides com atividade antiviral relatado por Araújo *et al* em 2011, podendo sugerir que a 7,7''-di-O-metilagathisflavona pode estar relacionada à branda atividade anti-Zika apresentada pelo extrato etanólico de folhas de *Ouratea castaneifolia*.

Tabela 11 - Valores de citotoxicidade (Vero) e atividade antiviral de frações obtidas de *Ouratea castaneifolia*, por cromatografia em coluna de sílica gel, frente ao ZIKV pela técnica colorimétrica do MTT

Extrato/Fração	CC₅₀ em VERO 72 horas (µg/mL)	CE₅₀ em ZIKV 72 horas (µg/mL)	Índice de Seletividade (IS)
Fração 29	30,5 ±2,18	NA	-
Fração 30	29,9 ±1,39	NA	-
Fração 30 Solúvel	12,7 ±1,78	NA	-
Fração 31	15,6 ±1,81	*	-
Fração 32	33,4 ±2,23	62,39 ±5,39	0,53
Fração 31-33 Solúvel	39,1 ±2,25	> 17,5	>2,23
Fração 35	72,2 ±1,72	NA	-
Fração 35 solúvel	97,9 ±1,44	NA	-
Fração 34 Solúvel	76,3 ±1,59	NA	-
Rutina	>200	*	-
Catequina	>500	NA	-
Epicatequina	>500	140,7 ±1,61	>3,55

*Não foi possível calcular o valor de CE₅₀

Como apresentado na Tabela 11, entre as frações obtidas da *Ouratea castaneifolia* DCM, as Fração 31, 32 e 31-33 solúvel apresentaram atividade antiviral frente ao ZIKV. A Fração 31 apresentou atividade antiviral porém não foi possível calcular CE₅₀. A fração 32 apresentou atividade moderada enquanto a Fração 31-33 solúvel mostrou-se muito ativa. Como mostrado no item 5.7, a Fração 31-33 solúvel apresentou, entre os compostos majoritários detectados, apenas a 4',4'',7,7''-tetra-O-metil-amentoflavona de diferente em relação à Fração 32, podendo sugerir que o maior efeito antiviral apresentado pela Fração 31-33 solúvel esteja relacionado a esta molécula.

Entre os três compostos que foram avaliados isolados (Rutina, catequina e epicatequina) ambos foram detectados no extrato etanólico de caules de

Ouratea semiserrata. A Rutina apresentou atividade antiviral porém não foi possível calcular sua CE₅₀. A epicatequina apresentou efeito antiviral baixo com CE₅₀ de 140,7 ±1,61 enquanto a Catequina não apresentou atividade antiviral. A Epicatequina, por ter sido detectada em extrato etanólico de caule de *Ouratea semiserrata*, pode-se sugerir que seja uma das moléculas que contribui para atividade antiviral do extrato desta espécie vegetal.

A partir dos extratos e suas respectivas frações avaliadas pelo ensaio antiviral, mesmo algumas que não foram possíveis calcular CE₅₀, observou-se que em concentrações específicas, alguns dos extratos/frações e compostos testados apresentaram um efeito protetor (Item 4.9.10) para as células frente ao efeito do ZIKV, como mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Efeito protetor apresentado por alguns extratos vegetais e frações frente ao efeito citopático do ZIKV, analisado pela técnica colorimétrica do MTT

Extrato/Fração	Concentração (µg/mL)	Efeito protetor (%)
<i>O. castaneifolia</i> Folhas	300	100,0
<i>O. semiserrata</i> Caule	100	100,0
<i>O. castaneifolia</i> AcOEt	200	100,0
<i>O. castaneifolia</i> Aquosa	400	70,0
Rutina	50	64,6
Fração 31	15	57,7

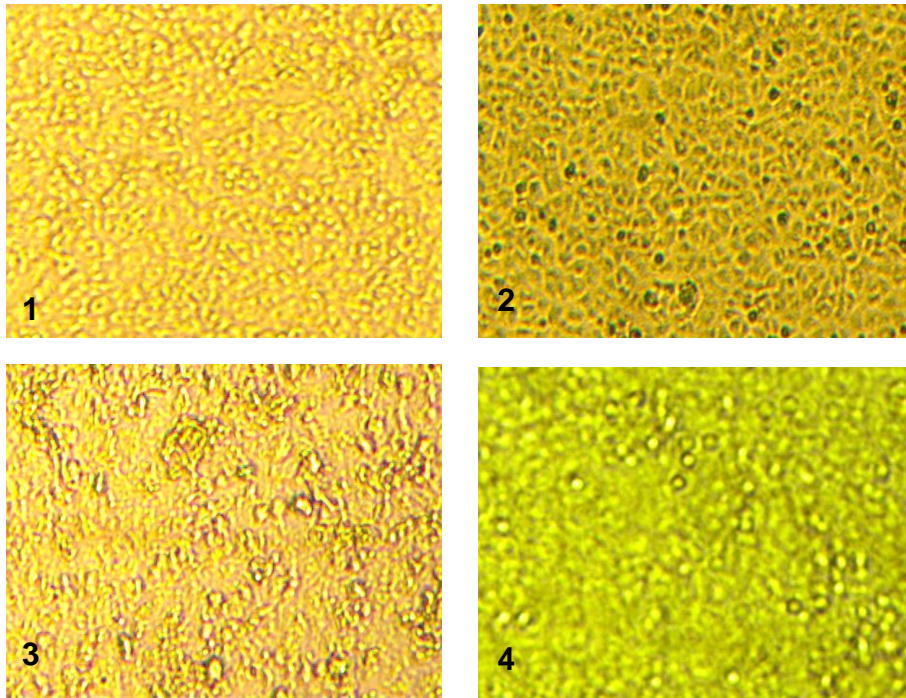
Destacam-se os resultados apresentados pelos extratos etanólicos de folhas de *Ouratea castaneifolia*, caules de *Ouratea semiserrata* e fração AcOEt de folhas de *Ouratea castaneifolia*, ambas apresentaram proteção de aproximadamente 100% das células que foram infectadas com o ZIKV, o que torna estas espécies potencialmente viáveis para pesquisas mais aprofundadas no descobrimento de novos fármacos antivirais, principalmente anti ZIKV, por não possuir no mercado medicamento para esta infecção viral.

Ouratea castaneifolia fração aquosa, *Ouratea spectabilis* fração DCM, Rutina e a Fração 31 também apresentaram atividade anti ZIKV com uma porcentagem de proteção significativa, como mostrados na tabela 12.

Para confirmar o efeito anti ZIKV de algumas amostras, foram realizados ensaios empregando placas de seis poços com os mesmos parâmetros empregados nos experimentos com placas de 96 poços. Os resultados dos experimentos para as amostras de extrato etanólico caule de *Ouratea semiserrata* e Rutina estão apresentados nas figuras 55 e 56 respectivamente. Observa-se que nas concentrações de 100 e 50µg/mL ocorreu 100% de proteção da monocamada celular para as duas amostras, comprovando mais uma vez a atividade anti ZIKV destas amostras.

Figura 55 – Efeito protetor realizado pelo extrato de caule de *Ouratea semiserrata* em células Vero infectadas por ZIKV em um período de 72h (1 e 5. Controle de células; 2e 6. Controle do extrato; 3 e 7. Controle Viral; 4e 8. Células infectadas com vírus e tratada com extrato)

24h de incubação



72h de incubação

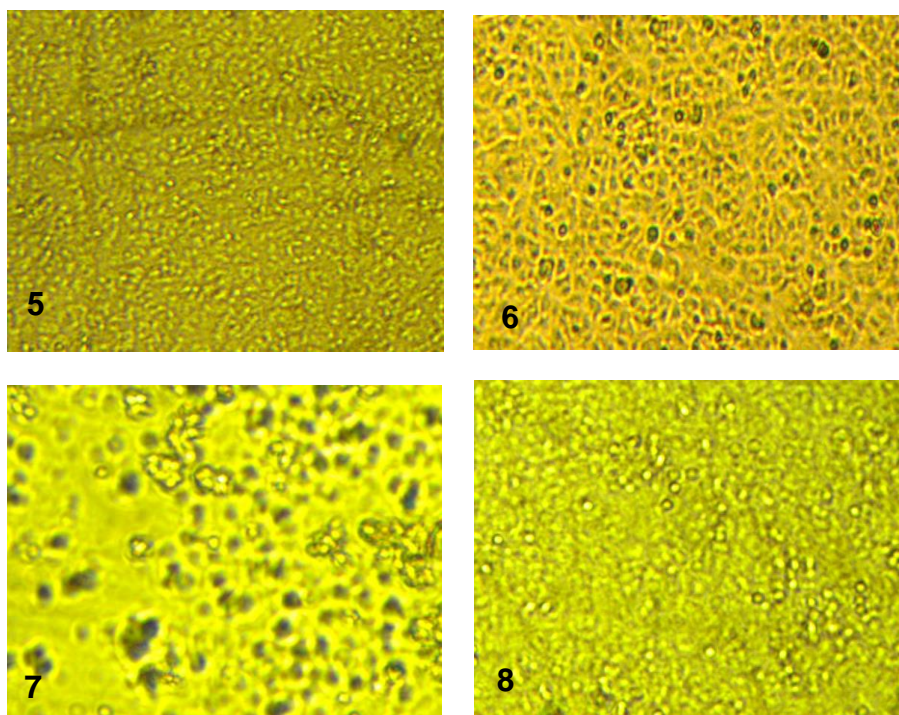
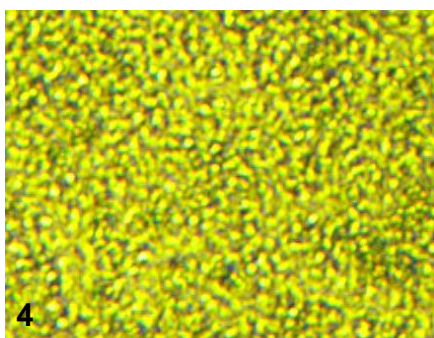
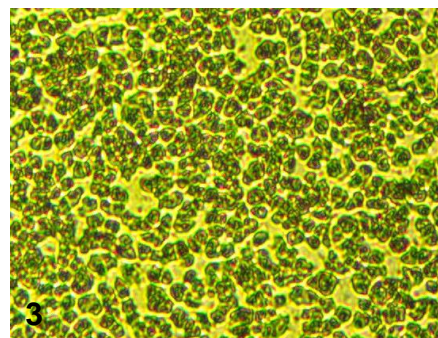
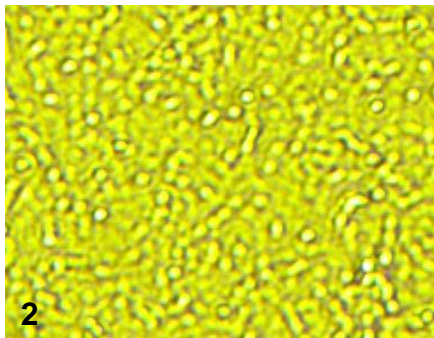
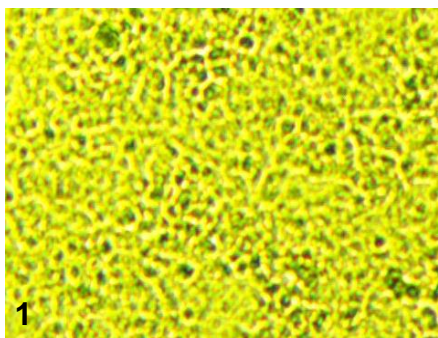


Figura 56 - Efeito protetor realizado pela Rutina em células Vero infectadas por ZIKV em um período de 72h (1. Controle de células; 2. Controle do extrato; 3. Controle Viral; 4. Células infectadas com vírus e tratada com extrato)



6 CONCLUSÃO

✓ *Ouratea castaneifolia*

Identificou-se quinze flavonoides no extrato etanólico das folhas de *Ouratea castaneifolia*, sendo quatro do tipo flavona, um flavonol e dez biflavonoides. Quanto à atividade protetora contra a ação do ZIKV, o extrato etanólico das folhas mostrou-se pouco ativo, a fração DCM muito ativo, a Fração 31 moderadamente ativo e a Fração 31-33 Solúvel muito ativo.

✓ *Ouratea spectabilis*

Identificou-se seis flavonoides no extrato etanólico das folhas de *Ouratea spectabilis*, todos do tipo biflavonoide. Quanto à atividade protetora contra a ação do ZIKV, tanto o extrato etanólico das folhas quanto as frações DCM, AcOEt e Aquosa, obtidas por partição líquido-líquido, não apresentaram efeito.

✓ *Ouratea semiserrata*

Identificou-se três flavonoides (flavonol, flavona e biflavonoide) e quatro proantocianidinas no extrato etanólico do caule de *Ouratea semiserrata*. Quanto à atividade protetora contra a ação do ZIKV, o extrato etanólico do caule apresentou uma excelente atividade anti-Zika com proteção de 100% da monocamada celular em uma concentração de 100µg/mL.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD-GARCÍA, B.; BERRUETA, L. A.; GARMÓN-LOBATO, S.; GALLO, B.; VICENTE, F. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 28, p. 5398-5415, 2009.

AGGARWAL, R.; AGGARWAL, H.; BASU, M.; CHUGH, P. Zika virus disease. **International Journal Of Community Medicine And Public Health**, v. 3, n. 6, p. 1352-1354, 2017.

AHMED, S.; HAYAT, M. Q.; TAHIR, M.; MANSOOR, Q.; ISMAIL, M.; KECK, K.; BATES, R. B. Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 460, 2016.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. (Ed.). **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. CRC press, 2005.

ARAUJO, M. F.; DOS SANTOS, C. B.; CAVALCANTI, J. F.; PEREIRA, F. S.; MENDES, G. S.; WERLE, A. A.; ROMANOS, M. T. V.; DE CARVALHO, M. G. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2489-2493, 2011.

BARROWS, N. J.; CAMPOS, R. K.; POWELL, S. T.; ROUTH, A.; BRADRICK, S. S.; GARCIA-BLANCO, M. A. A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. **Cell host & microbe**, v. 20, n. 2, p. 259-270, 2016.

BOULET, J.C.; DUCASSE, M. A.; CHEYNIER, V. Ultraviolet spectroscopy study of phenolic substances and other major compounds in red wines: relationship between astringency and the concentration of phenolic substances. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 23, n. 2, p. 193-199, 2017.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 2007.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; DOS SANTOS, J. R.; STEHMANN, J. R.; LOMBARDI, J. A.; DE OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, p. 223-236, 2011.

BRASIL, P.; SEQUEIRA, P. C.; FREITAS, A. D.; ZOGBI, H. E.; CALVET, G. A.; SOUZA, R. V. de.; SIQUEIRA, A. M.; MENDONÇA, M. C. L. de.; NOGUEIRA, R. M. B.; FILIPPIS, A. M. B. de.; SOLOMON, T. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1482, 2016.

BRUNETON, Jean. **Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas Medicinales**. 2 ed. ACRIBIA Editorial, 2001.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; SAMPAIO, S. A.; DE FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAÚJO, E. S. M.; DE SEQUEIRA, P.C.; DE MENDONÇA, M. C. L.; DE OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D. A.; SCHRAGO, C. G.; THOMPSON, F. L.; BRASIL, P.; DOS SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R.; TANURI, A.; DE FILIPPIS, A. M. B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.

Centers for Disease Control and Prevention: <<https://www.cdc.gov/media/releases/2016/s0413-zika-microcephaly.html>> Acesso em: 14 de Setembro de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention: <<https://portugues.cdc.gov/zika/healtheffects/gbs-qa.html>> Acesso em: 14 de Setembro de 2017.

Colombo, R., Yariwake, J.H., McCullagh, M. Study of C- and O-glycosylflavones in Sugarcane Extracts using Liquid Chromatography - Exact Mass Measurement Mass Spectrometry. **Journal Brazilian Society**, 3, 483-490, 2008.

CÔRTEZ, S. F.; VALADARES, Y. M.; DE OLIVEIRA, A. B.; LEMOS, V. S.; BARBOSA, M. P. T.; BRAGA, F. C. Mechanism of endothelium-dependent vasodilation induced by a proanthocyanidin-rich fraction from *Ouratea semiserrata*. **Planta medica**, v. 68, n. 05, p. 412-415, 2002.

DA COSTA, C. A.; DOS SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. Detection and typing of dengue viruses in *Aedes aegypti* (*Diptera*: Culicidae) in the City of Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 677-681, 2009.

DANIEL, J. F. S.; DE CARVALHO, M. G.; CARDOSO, R. S; AGRA, M. F.; EBERLIN, M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3B, p. 634-638, 2005.

DE OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. da C. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de pediatria**, v. 92, n. 2, p. 103-105, 2016.

DE RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1, p. 31-63, 2006.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DO NASCIMENTO, L. A. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; DA SILVA, M. N.; RODRIGUES, S. T.; DE CARVALHO, M. G. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneifolia* (DC.) Engl., Ochnaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 823-827, 2009.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T., RODRIGES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009.

European Centre for Disease Prevention and Control; Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/Zika-virus-French-Polynesia-rapid-risk-assessment.pdf>> Acesso em: 10 de Janeiro de 2018.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.

FELÍCIO, J. D.; GONÇALEZ, E.; BRAGGIO, M. M.; CONSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. **Planta medica**, v. 61, n. 03, p. 217-220, 1995.

FIDELIS, Q. C.; CASTRO, R. N.; GUILHON, G. M. S. P.; RODRIGUES, S. T.; DE SALLES, C. M.C.; DE SALLES, J. B.; DE CARVALHO, M. G. Flavonoids and other compounds from *Ouratea ferruginea* (Ochnaceae) as anticancer and chemopreventive agents. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7989-8000, 2012.

FIDELIS, Q. C.; RIBEIRO, T. A. N.; ARAÚJO, M. F.; DE CARVALHO, M. G. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 1-19, 2014.

Fundação Oswaldo Cruz: < <https://rededengue.fiocruz.br/noticias/432-zika-pelo-mundo>> Acesso em: 12 de Setembro de 2017.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 34, n. 11, p. 1453-1456, 2001.

GRARD, G.; CARON, M.; MOMBO, I. M.; NKOGHE, D.; ONDO, S. M.; JIOLLE, D.; FONTENILLE, D.; PAUPY, C.; LEROY, E. M. Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*?. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, p. e2681, 2014.

HADDOW, A. D.; SCHUH A. J.; CHADWICK, Y. Y.; KASPER, M. R.; HEANG, V.; HUY, R.; GUZMAN, H.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSENMAIR, K. E.; McKEY, D. Extraction and quantification of "condensed tannins" as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 11, p. 519-524, 2002.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 2379–2383, 1992.

Instituto Oswaldo Cruz; Disponível em:
<<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/sobreovirus.html>> Acesso em: 14 de Novembro de 2016.

JAISWAL, R.; JAYASINGHE, L.; KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the Rhododendron genus (Ericaceae) by tandem LC–MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, n. 4, p. 502-515, 2012.

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

LI, H.; DEINZER, M. L. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. **Analytical chemistry**, v. 79, n. 4, p. 1739-1748, 2007.

LI, Yao-Lan et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from Trollius chinensis Bunge. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 365-368, 2002.

LUZ, K. G.; DOS SANTOS, G. I. V.; VIEIRA, R. de M.. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 785-788, 2015.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: **The systematic identification of flavonoids**. Springer Berlin Heidelberg, p. 35-40, 1970.

MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. **Methods in plant biochemistry**, v. 1, p. 197-235, 1989.

MEDRADO, H. H. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BRANDÃO, H. N. Distribuição, atividade biológica, síntese e métodos de purificação de podofilotoxina e seus derivados. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 243-258, 2015.

MOHANTA, T. K. Plant metabolomics: missing link in next generation functional genomics era. **J Appl Biol Biotechnol**, v. 1, p. 001-010, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, M. T. de O.; TERZIAN, A. C.; SILVA, M. L. C. R.; ESTOFOLETE, C.; NOGUEIRA, M. L. Mosquito-transmitted viruses—the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016.

NARAYANA, K. R.; REDDY, M. S.; CHALUVADI, M. R.; KRISHNA, D. R.; Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 2-16, 2001.

NELWAN, E. J.; POHAN, H. T. Dengue convalescent rash in adult indonesian patients. **Acta Medica Indonesiana**, v. 46, n. 4, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde; Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-dengue>> Acesso em: 14 de Novembro de 2016.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde; Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/descricao-da-doenca-dengue>> Acesso em: 25 de julho de 2016.

PROPHIRO, J. S.; SILVA, O. S.; LUNA, J. E. D.; PICCOLI, C. F.; KANIS, L. A.; DA SILVA, M. A. N. *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): coexistence and susceptibility to temephos, in municipalities with occurrence of dengue and differentiated characteristics of urbanization. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 300-305, 2011.

Public Health England; Disponível em <<https://www.phe-culturecollections.org.uk/news/ecacc-news/cells-for-growing-zika-virus.aspx>> Acesso em: 20 de Janeiro de 2018.

RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R.; Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. **N Engl J Med**, v. 2016, n. 374, p. 1981-1987, 2016.

RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; JÚNIOR, S. B.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **Revista de Multiciência**, v. 7, p. 7-14, 2006.

ROMING, T. L.; WEBER, N. D.; MURRAY, B. K.; NORTH, J. A.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G.; CATES, R. G. Antiviral activity of Panamanian plant extracts. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 1, p. 38-43, 1992.

SALVADOR, G. S.; CERVI, A. C.; BROTTTO, M. L.; DOS SANTOS, É. P. A família Ochnaceae DC. no estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 423-434, 2010.

SANCHEZ, I.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; TABOADA, J.; RUIZ, B. H. Antiviral effect of flavonoids on the dengue virus. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 2, p. 89-92, 2000.

SANTOS, A. A. C.; OLIVEIRA, K. H. S.; CORONATO, B.; ANTÔNIO, E. R. Dengue: Sorotipos e suas adversidades. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, n. 30, p. 212, 2016.

SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1094-1117, 2000.

SAXENA, S. K.; ELAHI, A.; GADUGU, S.; PRASAD, A. K. Zika virus outbreak: an overview of the experimental therapeutics and treatment. **Virusdisease**, v. 27, n. 2, p. 111-115, 2016.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde; Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/12/Boletim-2017-043-final.pdf>> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde; Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf>> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais; Disponível em <http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/01-jan-fev-marc-abril/Boletins_AEDES/Boletim_Aedes_15-01-2018.pdf> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde; Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/dezembro/12/Boletim-2017-043-final.pdf>> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde; Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf>> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais; Disponível em <http://www.saude.mg.gov.br/images/noticias_e_eventos/000_2018/01-jan-fev-marc-abril/Boletins_AEDES/Boletim_Aedes_15-01-2018.pdf> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

SES - Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais; Disponível em <<http://www.saude.mg.gov.br/dengue>> Acesso em: 17 de Janeiro de 2018.

SHAFAEI, A.; SULTAN, K. M. S.; AISHA, A.; ABDUL, M. A. M.; HAMDAN, M. R.; MORDI, M. N.; ISMAIL, Z. Flavonoids-Rich Orthosiphon stamineus Extract as New Candidate for Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition: A Molecular Docking Study. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1500, 2016.

SICILIANO, T.; DE TOMMASI, N.; MORELLI, I.; BRACA, A. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6510-6515, 2004.

SIMOES, C. M. O. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817-836, 2003.

SUZART, L. R.; DANIEL, J F. de S.; DE CARVALHO, M. G.; KAPLAN, M. A. C. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* (Ochnaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 984, 2007.

SUZART, L. R.; DE CARVALHO, M. G.; CAVATTI, L. C.; KAPLAN, M. A. C. Chemical constituents from the inflorescences of *Ouratea hexasperma*. **Chemistry of Natural Compounds**, p. 1-2, 2012.

TEIXEIRA, R. R.; PEREIRA, W. L.; OLIVEIRA, A. F.; DA SILVA, A. M.; DE OLIVEIRA, A. S.; DA SILVA, M. L.; DA SILVA, C. C.; DE PAULA, S. O. Natural products as source of potential dengue antivirals. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8151-8176, 2014.

TUGIZIMANA, F.; PIATER, L.; DUBERY, I. Plant metabolomics: A new frontier in phytochemical analysis. **South African Journal of Science**, v. 109, n. 5-6, p. 01-11, 2013.

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.

VEITCH, N. C.; ELLIOTT, P. C.; KITE, G. C.; LEWIS, G. P. Flavonoid glycosides of the black locust tree, *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 479-486, 2010.

VELANDIA, J. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Novel Trichloro-and Tetrachloroisoflavone Isolated from *Ouratea Semiserrata*. **Natural Product Letters**, v. 12, n. 3, p. 191-198, 1998.

VELANDIA, J. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R.; WERLE, A. A. Biflavonoids and a glucopyranoside derivative from *Ouratea semiserrata*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 5, p. 283-292, 2002.

VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; BOEYÉ, A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. **Journal of General Virology**, v. 69, n. 7, p. 1749-1751, 1988.

WANG, M.; SIMON, J. E.; AVILES, I. F.; HE, KAN.; ZHENG, Q.; TADMOR, Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 601-608, 2003.

WHITEHORN, J.; NGUYEN, C. V. V.; KHANH, L. P.; KIEN, D. T. H.; QUYEN, N. T. H.; TRAN, N. T. T.; HANG, N. T.; TRUONG, N. T.; TAI, L. T. H.; HUONG, N. T. C.; NHON, V. T.; TRAM, T. V.; FARRAR, J.; WOLBERS, M.; SIMMONS, C. P.; WILLS, B. Lovastatin for the treatment of adult patients with dengue: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical infectious diseases**, v. 62, n. 4, p. 468-476, 2015.

World Health Organization; Disponível em
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>> Acesso em: 25 de Julho de 2017.

World Health Organization; Disponível em
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/guillain-barre-syndrome/en/>> Acesso em: 12 de Setembro de 2017.

World Health Organization; Disponível em
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/microcephaly/en/>> Acesso em: 12 de Setembro de 2017.

ZANDI, K.; TEOH, B. T.; SAM, S. S.; WONG, P. F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 1, 2011.

ZANDI, K.; TEOH, B. T.; SAM, S. S.; WONG, P. F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

ZANLUCA, C.; DE MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; DOS SANTOS, G. I. V.; DOS SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZHANG, B.; DENG, Z.; RAMDATH, D.; TANG, Y.; CHEN, P.; LIU, R.; LIU, Q.; TSAO, R. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. **Food chemistry**, v. 172, p. 862-872, 2015.

ZHANG, W.; XU, M.; YU, C.; ZHANG, G.; TANG, X. Simultaneous determination of vitexin-4 "-O-glucoside, vitexin-2 "-O-rhamnoside, rutin and vitexin from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by UPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 21, p. 1837-1844, 2010.

ZHANG, Y.; LI, Q.; YAN, L.; SHI, Y. Structural characterization and identification of biflavones in *Selaginella tamariscina* by liquid chromatography-diode-array

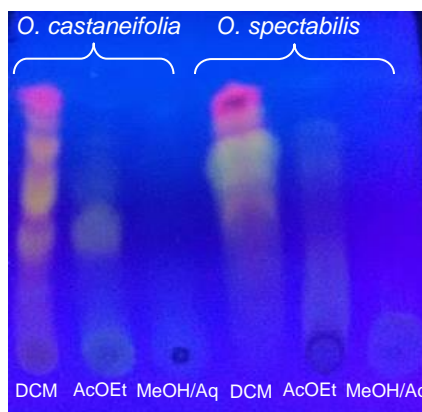
detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 15, p. 2173-2186, 2011

ANEXO I

ANEXO A – Cromatografia em camada delgada revelada em câmara UV a 254nm dos extratos etanólicos das folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* e caules de *Ouratea semiserrata* (OC: *O. castaneifolia*; OSP: *O. spectabilis*; OS: *O. semiserrata*)



ANEXO B – Cromatografia em camada delgada revelada em câmara UV a 254nm das frações obtidas por partição líquido-líquido das folhas de *Ouratea castaneifolia* e *Ouratea spectabilis* (DCM: Diclorometano; AcOEt: Acetato de etila; MeOH/Aq: Hidroalcoólica)



ANEXO B – Cromatografia em camada delgada revelada em câmara UV a 254nm das frações obtidas por cromatografia em coluna com sílica gel da fração diclorometano das folhas de *Ouratea castaneifolia*

