



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Maria Rosilda Valente de Sarges

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIVIRAL DE *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.**

BELEM – PA

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIVIRAL DE *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.**

Autora: Maria Rosilda Valente de Sarges
Orientadora: Profa. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Wender Portal Gomes

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

S245e Sarges, Maria Rosilda Valente de.
Estudo químico e avaliação da atividade antiviral de
Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbr. / Maria Rosilda Valente
de Sarges. — 2025.
72 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka E
Silva

Coorientador(a): Prof. Dr. Paulo Wender Portal Gomes
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2025.

1. Apuleia. 2. Fitoquímica. 3. Prospeção antiviral. I.
Título.

CDD 615.4

Maria Rosilda Valente de Sarges

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
Apuleia leiocarpa (Vogel) J.F. Macbr.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 24/01/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wandson Braamcamp de Souza Pinheiro – PPG-BIONORTE/UFPA
(Examinador externo)

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva – PPGCF/UFPA
(Examinador interno)

Profa. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva
(Presidente)

*Dedico este trabalho a Deus, por ser meu
sustento em todos os momentos, a minha
mãe Rosilda Cardoso, ao meu pai Manoel
Figueiró, e a todos os mestres que guiaram
meu caminho até esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo apoio, força e amor que me sustentou nos momentos de dificuldade, e pela dádiva de encaminhar tudo conforme seus planos.

À minha família: minha mãe Rosilda Cardoso e ao meu pai Manoel Figueiró, por seu apoio, amor e compreensão; meu companheiro de vida, Giovanni, pelo incentivo e por sempre acreditar nas minhas conquistas; minha irmã Regiane pelo apoio, conselhos e carinho.

À minha orientadora profa. Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva, pela atenção, conselhos e cuidados que ultrapassaram a realização deste trabalho e se estenderam para a minha vida pessoal.

Ao meu coorientador prof. Dr. Paulo Wender Portal Gomes, por todos os ensinamentos e ajuda prestada.

À Dra. Sônia das Graças Santa Rosa Pamplona, carinhosamente chamada de “Soninha”, por ser minha mãe de laboratório, me ensinando e corrigindo meus erros sempre com muita paciência e amor, agradeço pela amizade e por ser um anjo de Deus na minha vida.

Ao prof. Dr. Milton Silva, por me receber no LABCROL e pelos ensinamentos.

Ao prof. Dr. Wandson Braamcamp, pelos ensinamentos.

À família LABCROL: Horrana Mardegan, Tainá Martins, Ana Paula França, Edina Raquel Meneses, Allana Martins, Rayane Reis, Alice Carvalho, Diogo Reis, Loueny Andrade, Giovana Santos e os demais membros do laboratório e Central de Extração.

À Universidade Federal de Ouro Preto, especialmente a profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães, Dra. Arianne Ferraz e Dra. Marília Menegatto pela parceria em realizar os testes antivirais.

À coordenação e todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF).

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“É correta por aceitar a premissa de que
nunca se deve subestimar a informação
sobre plantas medicinais oriunda da
sabedoria popular (...)”*

Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos

RESUMO

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.

As plantas medicinais representam parte da cultura de povos tradicionais, pois são muito utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Dentre estas, destaca-se *Apuleia leiocarpa* – utilizada na medicina tradicional e considerada promissora para prospecções fitoquímicas e farmacológicas. Nesse sentido, extratos das folhas e casca de *A. leiocarpa* foram investigados quanto ao perfil molecular e seus potenciais antivirais. Os extratos etanólicos e aquosos das folhas e casca de *A. leiocarpa* foram analisados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e, paralelamente, foram submetidos a ensaios antivirais *in vitro* frente as cepas de Mayaro (MAYV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) e Oropouche (OROV). Os dados referentes ao perfil de metabólitos secundários foram processados e então analisados por abordagem de redes moleculares e buscas paralelas contra espectros de referência disponíveis em bibliotecas espectrais da plataforma Global Natural Product Social (GNPS). De forma preliminar, todos os extratos apresentaram atividade antiviral para quase todos os arbovírus testados. Além disso, destaca-se a potente atividade antiviral do extrato etanólico da casca de *A. leiocarpa* contra cepas de OROV (CE₅₀ 14,85 µg/mL e índice de seletividade 51,50). Este resultado foi associado ao perfil molecular, que revelou a presença majoritária de flavonóides e terpenos no extrato etanólico da casca de *A. leiocarpa*, com destaque aos compostos luteolina (**13**), (iso)luteolina (**15**), ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (**27**) e ácido betulínico (**28**). Portanto, vale ressaltar o potencial antiviral do extrato etanólico da casca de *A. leiocarpa*.

Palavras-chaves: *Apuleia*; Fitoquímica; Prospecção antiviral.

ABSTRACT

CHEMICAL STUDY AND ANTIVIRAL ACTIVITY EVALUATION OF *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J.F. Macbr.

Medicinal plants are an integral part of the cultural heritage of traditional peoples, as they are widely utilized in the treatment of a range of illnesses. Among these is *Apuleia leiocarpa*, which has been employed in traditional medicine and is regarded as a promising subject for phytochemical and pharmacological investigation. The molecular profile and antiviral potential of extracts derived from the leaves and bark of *A. leiocarpa* were investigated. The ethanolic and aqueous extracts of the leaves and bark of *A. leiocarpa* were subjected to analysis by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. In parallel, the extracts were tested *in vitro* for antiviral activity against strains of Mayaro (MAYV), Chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV), and Oropouche (OROV). The data pertaining to the secondary metabolite profile was subjected to processing and subsequent analysis through the lens of a molecular network approach, complemented by parallel searches against reference spectra accessible within spectral libraries on the Global Natural Product Social (GNPS) platform. In preliminary tests, all the extracts demonstrated antiviral activity against nearly all the arboviruses that were tested. Notably, the ethanolic extract of *A. leiocarpa* bark demonstrated particularly potent antiviral activity against OROV strains, with a EC_{50} value of 14.85 $\mu\text{g/mL}$ and a selectivity index of 51.50. This encouraging outcome was linked to the molecular profile, which indicated the predominant presence of flavonoids and terpenes in the ethanolic extract of *A. leiocarpa* bark, particularly the compounds luteolin (**13**), (iso)luteolin (**15**), 2-O-p-coumaroyl aliphatic acid (**27**), and betulinic acid (**28**). It is thus noteworthy to emphasize the antiviral potential of the ethanolic extract of *A. leiocarpa* bark.

Keywords: *Apuleia*; Phytochemistry; Antiviral prospecting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore de <i>Apuleia leiocarpa</i>	16
Figura 2 - Folha e frutos de <i>Apuleia leiocarpa</i>	17
Figura 3 - Substâncias isoladas e relatadas em estudos anteriores de <i>Apuleia leiocarpa</i>	18
Figura 4 - Estrutura básica de um flavonoide.....	19
Figura 5 - Estrutura do ácido betulínico, um exemplo de triterpenoide de esqueleto lupano.....	20
Figura 6 - Cromatogramas de íons totais dos extratos EEBAI, AEBAI, EELAI e AELAI.....	34
Figura 7 - Proposta de fragmentação para os isômeros de procianidina B (1, 2).....	40
Figura 8 - Proposta de fragmentação para procianidina C (3, 5).....	41
Figura 9 - Proposta de fragmentação para (epi)catequina (4).....	42
Figura 10 - Proposta de fragmentação para os isômeros de (neo)astilbina, astilbina e (iso)astilbina (10, 11 e 12).....	44
Figura 11 - Compostos anotados dos extratos etanólicos e aquosos da casca e folhas de <i>A. leiocarpa</i>	48
Figura 12 - Redes moleculares baseada na abundância relativa de metabólitos dos extratos etanólicos e aquosos das folhas e casca de <i>A. leiocarpa</i>	49
Figura 13 - Compostos em destaque do extrato etanólico da casca do caule.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Extratos produzidos a partir da casca e folhas de <i>A. leiocarpa</i>	26
Tabela 2 - Anotação dos compostos dos extratos etanólicos e aquosos da folha e casca do caule de <i>A. leiocarpa</i>	36
Tabela 3 - Valores das concentrações citotóxicas (CC ₅₀) apresentadas pelos extratos.....	50
Tabela 4 - Concentrações efetivas dos extratos em relação a 50% células infectadas e índice de seletividade dos extratos em relação às arboviroses descritas neste estudo (OROV, MAYV, CHIKV e ZIKV).....	51

LISTA DE SIGLAS

AEBAI	Extrato aquoso da casca
AELAI	Extrato aquoso das folhas
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CE ₅₀	Concentração eficaz com 50% de efeito antiviral
CHIKV	Chikungunya vírus
DENV	Dengue vírus
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEBAI	Extrato etanólico da casca
EELAI	Extrato etanólico das folhas
GNPS	Global Natural Product Social
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IS	Índice de Seletividade
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de Massas
MAYV	Mayaro vírus
MS/MS	Espectrometria de Massas em Tandem
MTT	4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OROV	Oropouche vírus
NMR	Ressonância magnética nuclear
ZIKV	Zika vírus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Taxonomia e características da <i>A. leiocarpa</i>	15
2.2 Constituintes químicos	17
2.2.1 FLAVONOIDES.....	19
2.2.2 TRITERPENOIDES.....	19
2.3 Atividades biológicas de <i>A. leiocarpa</i>.....	20
2.4 Arboviroses.....	21
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo geral.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Coleta, identificação e registro.....	25
4.2 Tratamento do material vegetal e obtenção dos extratos.....	25
4.3 Extração em fase sólida.....	26
4.4 Análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa.....	27
4.5 Processamento dos dados	28
4.6 Análise da rede molecular	29
4.7 Análise antiviral dos extratos	29
4.7.1 LINHAGENS DE CÉLULAS, VÍRUS E EXTRATOS.....	29
4.7.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	31
4.7.3 TESTES DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	32
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Anotação de compostos	34
5.2 Citotoxicidade dos extratos.....	50
5.3 Atividades antivirais	50
6 DISCUSSÕES.....	54
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por arbovírus, transmitidos por vetores artrópodes, tem provocado problemas de saúde pública graves, incluindo milhares de mortes por febre hemorrágica pelo vírus Dengue, várias incapacidades físicas resultantes dos efeitos crônicos da infecção pelo vírus Chikungunya, infecção congênita pelo vírus Zika causando microcefalia, doenças neurológicas graves, como a meningite asséptica por complicação rara causada pelo vírus Oropouche (Kharwadkar e Herath, 2024; OPAS/OMS, 2024).

Segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde, um total de 10.275 casos confirmados de Oropouche, incluindo duas mortes, foram documentados na Região das Américas até outubro de 2024. Além disso, o número de casos notificados de Chikungunya está aumentando, com total de 427.622 casos notificados na Região das Américas em 2024, e ademais 40.690 casos totais de Zika durante o mesmo período. Os sintomas mais comuns associados ao vírus Chikungunya (CHIV), vírus Mayaro (MAYV), vírus Oropouche (OROV) e vírus Zika (ZIKV) são febre alta, mialgia, cefaleia intensa, artralgia e casos mais graves causam até morte (Carvalho *et al.*, 2022; Côrtes *et al.*, 2023; Dias *et al.*, 2022, Zhao *et al.*, 2023). No entanto, o tratamento dessas infecções virais está atualmente limitado a medidas paliativas, pois não há agentes antivirais específicos disponíveis para a maioria desses vírus (Santos *et al.*, 2020). Nesse contexto, a busca por compostos naturais de plantas para o tratamento de arboviroses tem surgido como uma alternativa promissora (Thomas *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2022).

Historicamente, a descoberta de medicamentos antivirais tem sido um desafio devido às rápidas taxas de mutação dos vírus. No entanto, as plantas são conhecidas por serem uma fonte valiosa de moléculas antivirais. Muitas moléculas derivadas de plantas exibem atividade antiviral em diferentes fases do ciclo de replicação viral, como a adsorção viral, a replicação do genoma e a maturação de novas partículas (Musarra-Pizzo *et al.*, 2021, Trembl *et al.*, 2020). Por exemplo, o kaempferol e o ácido p-cumárico bloqueiam ou reduzem a entrada do vírus nas células, interferem na expressão das proteínas da célula hospedeira e interferem na replicação do rinovírus humano (Kwon *et al.*, 2020). Outro mecanismo estudado é o geraniol, um

monoterpenóide encontrado no óleo essencial de *Thymus bovei*, este composto se liga ao sítio ativo da protease do herpesvírus humano tipo 2 e atua como um inibidor competitivo (Hassan *et al.*, 2018). No cenário atual, em que a busca por agentes antivirais ganhou urgência, destacamos a espécie *Apuleia leiocarpa*, uma planta nativa da América do Sul e facilmente encontrada na região amazônica, como uma via promissora para a descoberta de novos compostos antivirais.

A. leiocarpa é utilizada na medicina popular tradicional. Os indígenas bolivianos Chacobo utilizam a decocção da casca do tronco para tratar a febre, um sintoma comum de doenças causadas por CHIKV, OROV, ZIKV e MAYV (Muñoz *et al.*, 2000). Nesse sentido, devido a utilização de *A. leiocarpa* na medicina tradicional, e reconhecendo a eficácia antiviral já relatada para muitos metabolitos especializados de plantas, neste estudo descrevemos os principais metabólitos detectados dos extratos das folhas e da casca de *A. leiocarpa*. Além disso, foram realizados ensaios antivirais *in vitro* para mapear as propriedades antivirais contra os vírus Oropouche, Mayaro, Chikungunya e Zika e suas biomoléculas potencialmente associadas, trazendo novidades na busca de agentes eficazes para o tratamento de arbovírus. Trata-se de uma prospecção química e farmacológica preliminar que dará impulso a novas pesquisas antivirais com *A. leiocarpa*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia e características da *A. leiocarpa*

A *A. leiocarpa* pertence à família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae. Esta família apresenta como característica a produção de frutos na forma de vagem. Ademais, a Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas em termos de número de espécies, depois da Asteraceae e Orchidaceae. A classificação da Leguminosae ocorre pela divisão nas seis subfamílias Caesalpinioideae, Dialioideae, Detarioideae, Cercidoideae, Papilionoideae e Duparquetioideae, e constituída por 19000 espécies (Falcão *et al.*, 2020). Além disso, a Dialioideae compreende 17 gêneros e 90 espécies. Nesse sentido, a *A. leiocarpa* é classificada como uma Dialioideae, pois, como aspecto desta subfamília, possui as inflorescências cimosas, com peculiaridades no xilema, e um elevado grau de perda de órgãos (LPWG, 2017).

O gênero *Apuleia* é monoespecífico, compreendendo a única espécie *Apuleia leiocarpa* (Vogel) JF Macbr. Essa espécie possui algumas sinonímias como *Apuleia praecox* Mart., *Apuleia grazielana* Afr.Fern., *Apuleia molaris* Spruce ex Benth., *Leptolobium leiocarpum* Vogel. *A. leiocarpa* possui ampla extensão geográfica na América do Sul: Brasil, Bolívia, Argentina e o Uruguai (de Sousa; Lewis; Hawkins, 2010). A espécie é de valor estimado no mercado madeireiro, pois a madeira dispõe de vasta funcionalidade na construção de estruturas externas, construção civil, construções navais, marcenaria e carpintaria. Contudo, devido a exploração extensiva, a planta está incluída na lista de espécies de árvores ameaçadas de extinção, e atualmente é classificada como vulnerável (de Souza Silva *et al.*, 2022).

A. leiocarpa é conhecida por vários nomes de acordo com a região, popularmente os nomes mais comuns são “amarelão”, “amarelinho”, garapa, grápia, garapeira, garapeiro e gema-de-ovo. Esta espécie é uma árvore caducifólia, de porte grande e pode alcançar até 40 m de altura. Esta planta possui as folhas alternas, compostas, imparipinadas, de 8 a 15 cm de comprimento, com cerca de 5 a 11 folíolos alternos e pequenos; a copa é larga e ramificada; o tronco é irregular a cilíndrico; a

casca é fina, cor pardo-amarelada a branco-acinzentada, áspera e com escamas delgadas; o fruto é uma vagem oblonga, achatada e de cor castanho-claro (Carvalho, 2003; Salman *et al.*, 2008). Na Figura 1 e 2 é possível observar a espécie.



Figura 1 - Árvore de *Apuleia leiocarpa*.

Fonte: Alan Hentz, 2024 (licenciado sob <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)
<https://www.inaturalist.org/photos/355094482>
<https://www.gbif.org/occurrence/4606898328>



Figura 2 – Folha e frutos de *Apuleia leiocarpa*

Fonte: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:16766-2/images#source-LOWO>

2.2 Constituintes químicos

Os estudos acerca dos metabólitos secundários de *A. leiocarpa* são escassos. Apesar disso, alguns estudos demonstraram a riqueza de compostos da classe dos flavonoides e terpenos. Um estudo realizado por Braz Filho e Gottlieb (1971) isolou compostos como (+)-pinitol, β -sitosterol, ayanina, oxiaianina A, oxiaianina B, apuleina, 5-O-desmetilapuleina, apuleisina, apuleitrina, apuleirina, apuleidina, 5-O-metiloxiaianina A e leiocarpina. Mais recente, Barra (2015) estudou as raízes e cascas do caule, em que isolou triterpenos, fitoesteróis, diidroflavonois e flavonóis, apresentados na Figura 3.

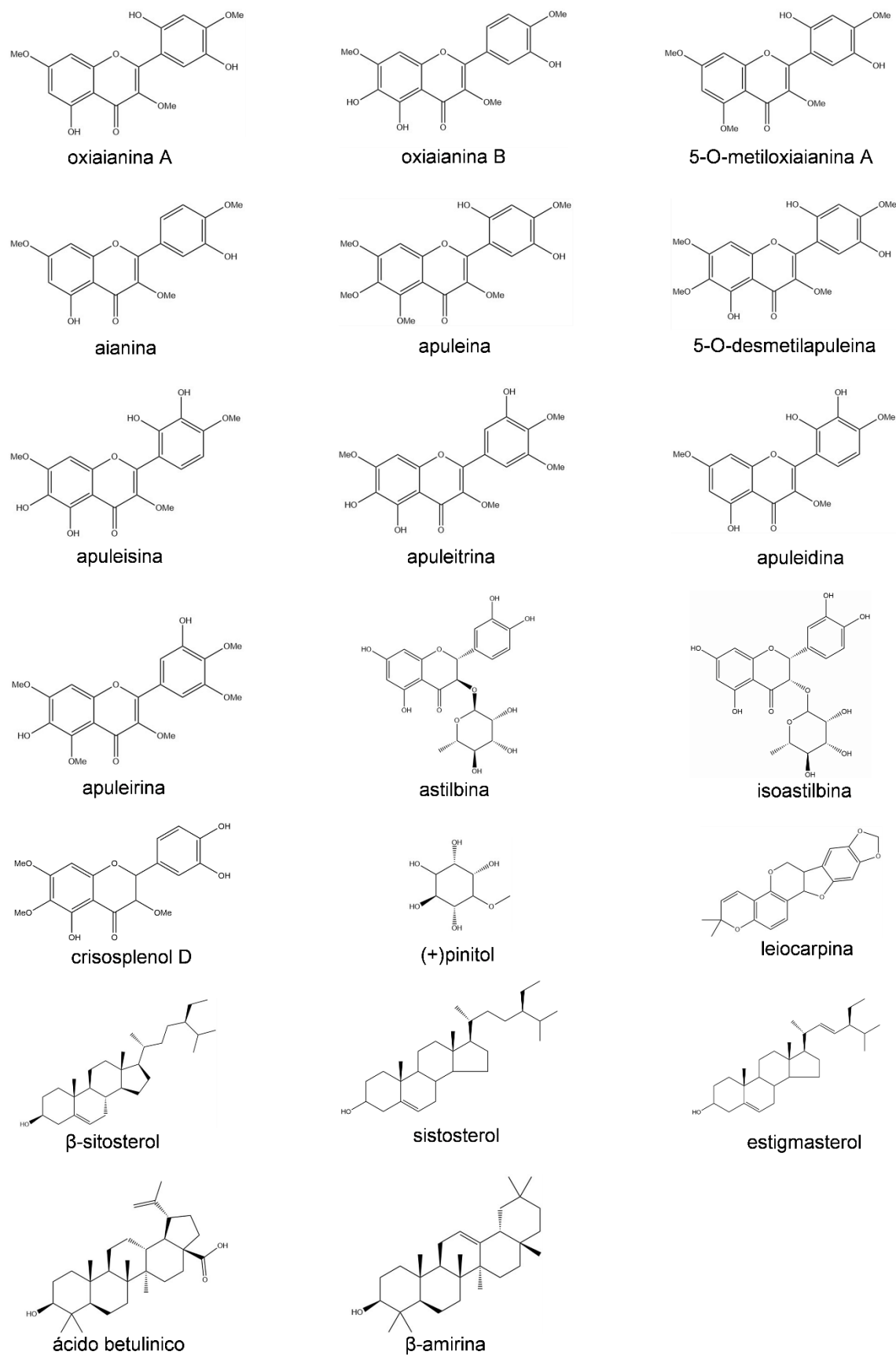


Figura 3 - Substâncias isoladas e relatadas em estudos anteriores de *Apuleia leiocarpa*. Fonte: adaptado de Braz Filho e Gottlieb (1971) e Barra (2015).

2.2.1 FLAVONOIDES

Os flavonoides são compostos conhecidos por suas atividades antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias, antivirais, antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas e neuroprotetoras (Al-Khayri *et al.*, 2022). A constituição dos flavonoides consiste em uma estrutura básica de carbono $C_6-C_3-C_6$, composta por um anel de benzeno A, um pirano C e um fenil nomeado de anel B, conforme a figura 4. As possibilidades da presença de substituintes, como os grupos hidroxila, metoxila e glicosil, em diferentes posições dessa estrutura base, proporcionam a variedade de flavonoides conhecidos, entre eles as subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, isoflavonas, flavan-3-óis, antocianinas e chalconas (Rauter *et al.*, 2018).

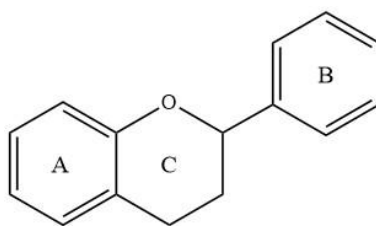


Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide.

2.2.2 TRITERPENOIDES

Os triterpenoides são relatados com ação antioxidantes, neuroprotetores anticancerígenos, anti-inflamatórios, antiateroscleróticos, antiviral, hepatoprotetores e imunomoduladores. Em termos estruturais, os triterpenoides possuem 30 átomos de carbono, a estrutura é formada por 6 unidades de isopreno que equivalem a 3 unidades de terpeno. Os triterpenoides são triterpenos que contêm heteroátomos, comumente átomos de oxigênio, podendo apresentar vários substituintes. Conforme a variedade de triterpenoides conhecidos, os mais comuns são os de esqueletos oleano, ursano e lupano. A estrutura de um triterpenoide do tipo lupano pode ser visualizada na figura 5 (Mantiniotou *et al.*, 2025).

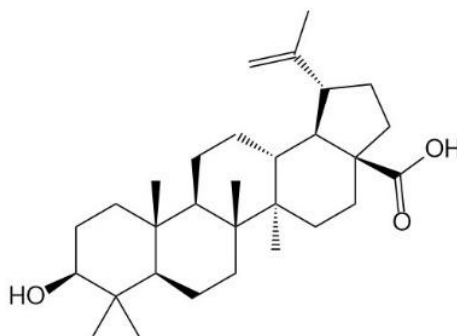


Figura 5 – Estrutura do ácido betulínico, um exemplo de triterpenoide de esqueleto lupano.

2.3 Atividades biológicas de *A. leiocarpa*

Na medicina popular da Bolívia, indígenas utilizam decocção da casca do caule de *A. leiocarpa* como antipirético. Outro uso popular é para tratamento de úlceras externas, em que a decocção é aplicada como tônico (Muñoz *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2015). No entanto, até então poucos estudos acerca das atividades biológicas da *A. leiocarpa* foram relatados. Dentre estes, destaca-se um estudo de Muñoz *et al.* (2000), em que investigou a atividade antimalárica, e o extrato hidroetanólico da casca do caule inibiu em 53% o *Plasmodium berghei*, na dose de 250 mg/kg, demonstrando possuir uma atividade antimalárica significativa. Outrossim, Ruppelt *et al.* (1991) avaliaram a atividade analgésica e anti-inflamatória de várias plantas, dentre as quais, o extrato aquoso da casca e cerne de *A. leiocarpa* apresentou atividade anti-inflamatória *in vivo* em camundongos.

Em outro estudo, Silva *et al.* (2015) analisou a atividade antibiofilme e antibacteriana de 14 plantas, e o extrato aquoso dos frutos de *A. leiocarpa* apresentou potencial atividade antibiofilme contra *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Carvalho *et al.* (2015) testou o potencial antibacteriano de uma lectina das sementes de *A. leiocarpa*, na qual *Xanthomonas campestris* foram susceptíveis. Ademais, Agostini *et al.* (2019) avaliou o extrato aquoso das folhas contra bactérias marinhas naturais, e observou-se uma inibição considerável do filme bacteriano ($\geq 80\%$) na concentração de 0,5 mg/mL. Mais recente, Azevedo *et al.* (2024) relatou que os extratos diclorometano do caule e etanólico da casca inibiram a viabilidade celular

na linhagem NSCLC (H460) e foram capazes de induzir apoptose dependente da dose, apontando atividade contra o câncer de pulmão.

Arruda (2012) avaliou os potenciais antioxidante, anticolinesterásico e antifúngico de extratos das folhas, caule, raiz, casca e alburno. Os testes antioxidante e anticolinesterásico demonstraram atividade positiva. Em adição, as amostras do caule mostraram atividade frente ao fungo *Cladosporium sphareospermum*. Barra (2015) investigou a atividade antiproliferativa de extratos etanólicos, diclorometano e acetato de etila das folhas, casca do caule, caule, alburno e raiz. A avaliação mostrou que o extrato de acetato de etila da raiz detinha potencial antiproliferativo em gliomablastoma humano U87, tumor cerebral maligno.

Até o momento, não há estudos do gênero *Apuleia* em relação à atividade antiviral. No entanto, a família Fabaceae apresenta algumas espécies estudadas contra viroses. Nesse panorama, um extrato etanólico de soja (*Glycine max*) mostrou atividade inibitória nos estágios iniciais da infecção por H1N1 e H3N2 (Kwon *et al.*, 2022). Ademais, compostos isolados de *Glycyrrhiza uralensis* inibem potentemente a infecção por SARS-CoV-2, afetando a entrada e a replicação do vírus (Yi *et al.*, 2022). Além disso, um trabalho com frações do extrato metanólico das folhas de *Cassia australis* apresentou atividade antiviral contra o arbovírus Mayaro (Spindola *et al.*, 2014).

2.4 Arboviroses

Os arbovírus compreendem um grupo de vírus que em seus ciclos biológicos possuem vetores artrópodes, mosquitos ou carrapatos, que posteriormente transmitem esses para hospedeiros vertebrados durante a alimentação sanguínea (Coffey *et al.*, 2013). Estes vírus predominam em países de clima tropical e subtropical, pela capacidade de adaptação a novos vetores e condições ambientais (Andreolla *et al.*, 2022). Os mosquitos são vetores prevalentes em algumas arboviroses: o vírus Mayaro é de transmissão restrita aos gêneros silvestres de *Sabethes* e *Haemagogus*; os vírus Chikungunya e Zika são transmitidos principalmente por mosquitos vetores do gênero *Aedes*; o vírus Oropouche em que o

principal vetor é mosquito *Culicoides paraenses*, porém também transmitido por espécies dos gêneros *Aedes* e *Culex* (Lorenz; Ribeiro; Chiaravalloti-Neto, 2019; Vernal; Martini; da Fonseca, 2019).

O Mayaro vírus (MAYV) pertence ao gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae*. Esse vírus causa a febre Mayaro, caracterizada por artralgia de longa duração, semelhante à que ocorre na dengue (Andreolla *et al.*, 2022). Nesse contexto, os principais sintomas incluem calafrios, febre, manifestações gastrointestinais, tontura, coceira, dor ocular, mialgia e artralgia durando de meses a anos. Assim, as características da infecção por MAYV a tornam mais debilitante do que a de outros arbovírus, na medida em que nas outras arboviroses os sintomas podem durar aproximadamente três a quatro semanas (Diagne *et al.*, 2020). A estrutura genômica consiste em RNA de fita simples com polaridade positiva, em que forma dois quadros de leitura abertos: a expressão de uma poliproteína que é clivada durante e após a tradução em quatro proteínas não estruturais - NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4 -, e os genes estruturais que geram as seis proteínas estruturais - C, E1, E2, E3, 6K e transframe (Carvalho *et al.*, 2017).

O Chikungunya vírus (CHIKV) consiste em um *Alphavirus* da família *Togaviridae* (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). A infecção por CHIKV é caracterizada por febre abrupta associada a dores articulares, em que também são relatados poliartralgia incapacitante, artrite, erupção cutânea, mialgia e cefaleia. A dor articular pode ser persistente e durar meses ou anos após a fase aguda da doença (de Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). Este arbovírus possui o RNA de fita simples de sentido positivo, em que o genoma é organizado em dois quadros de leitura abertos, um codifica quatro proteínas não estruturais - NSP1, NSP2, NSP3 E NSP4 -, e o segundo quadro de leitura codifica cinco proteínas estruturais, incluindo o capsídeo, o peptídeo 6K/TF e as três proteínas do envelope E1, E2 e E3 (Montalvo Zurbia-Flores; Reyes-Sandoval; Kim, 2023).

O Zika vírus (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. O ZIKV pode ser transmitido por mosquitos, contato sexual humano e verticalmente, de mulheres grávidas infectadas para o feto (Pielnaa *et al.*, 2020). Esse é um vírus de RNA de sentido positivo de fita simples e envelopado. O genoma do vírus é composto por um quadro de leitura aberto que codifica uma única poliproteína, a qual é

processada por enzimas celulares e proteases virais em 10 proteínas. Estas proteínas virais incluem três proteínas estruturais de envelope, membrana e capsídeo que formam a partícula viral, e sete proteínas não estruturais - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 - que são necessárias para o processamento, replicação e montagem de novos vírus (Giraldo; Gonzalez-Orozco; Rajsbaum, 2023).

O Oropouche vírus (OROV) pertence ao gênero *Orthobunyavirus*, da família Peribunyaviridae (Romero-Alvarez *et al.*, 2023). Os principais sintomas envolvem dor de cabeça intensa, dor muscular, náusea e diarreia. A transmissão desse vírus é através do mosquito *Culicoides paraenses*, porém, recentemente, no fim do ano de 2024, está sendo investigada a possível transmissão vertical desse vírus para o feto, causando até morte fetal (OPAS/OMS, 2024). O OROV é um vírus envelopado com genoma tripartido composto por três segmentos de RNA de sentido negativo de cadeia simples. O segmento pequeno possui duas estruturas de leitura aberta sobrepostas, que codificam a proteína N do nucleocapsídeo e a proteína não estrutural NSs. O segmento médio codifica uma poliproteína que é clivada após a tradução nas glicoproteínas estruturais Gn e Gc, e na proteína não funcional NSm. O segmento grande codifica a proteína L e uma polimerase de RNA dependente de RNA. Todavia, não há estudos estruturais de alta resolução para o OROV, porém, com base em estudos com outros *Orthobunyavirus*, sugere-se que o vírus expressa Gn e Gc na superfície e contém três complexos de ribonucleoproteína - os segmentos de RNA com muitas cópias de proteínas N e L (Barbosa *et al.*, 2023; Files *et al.*, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil químico e potencial antiviral de *A. leiocarpa* contra quatro tipos de arboviroses (MAYV, CHIKV, ZIKV e OROV).

3.2 Objetivos específicos

- Obter extratos etanólicos e aquosos das folhas e casca de *A. leiocarpa*;
- Investigar o perfil químico dos extratos através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas;
- Contribuir com o conhecimento químico dos metabólitos produzidos pela espécie *A. leiocarpa*;
- Investigar a toxicidade *in vitro* dos extratos;
- Investigar atividade antiviral *in vitro* dos extratos contra quatro arbovírus (MAYV, CHIKV, ZIKV e OROV).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta, identificação e registro

O espécime foi coletado no município de Belém/PA, em 20/11/2022. Foram obtidas amostras das folhas e casca do caule. A identificação e coleta foi realizada pelo Sr. Manoel Cordeiro, da instituição Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-Amazônia Oriental), e as exsiccatas foram depositadas no herbário, com as seguintes informações: Herbário IAN – nº de registro – 202191. O acesso ao patrimônio genético foi legalizado na plataforma Sisgen, com número de cadastro A57C662.

4.2 Tratamento do material vegetal e obtenção dos extratos

Após a coleta, as partes do espécime foram lavadas com água corrente e secas em estufa de ventilação a 45°C até peso constante. Posteriormente, a casca e folhas secas foram trituradas em moinhos de facas conforme Simões *et al.* (2017). Os materiais pulverizados foram extraídos na proporção de 1:10 (p/v), utilizando como solventes etanol 99,5% (Soltech - Diadema, SP, Brasil) e água ultrapura no sistema Milli-Q® Diret 5 UV da Merck Millipore (Darmstadt, HE, Alemanha).

Nesse sentido, os extratos etanólicos das cascas e folhas foram obtidos por maceração, no qual 100g de cada matriz e 1 L de etanol estiveram em contato em frascos separados para cada parte da planta, por dois ciclos de 24h, em temperatura ambiente. Após, as soluções foram filtradas em um sistema à vácuo e os extratos levados para secagem em estufa (45°C) até peso constante (Brasil, 2023). Os processos de maceração geraram: EEBAI (extrato etanólico da casca) com rendimento de 10%, e EELAI (extrato etanólico das folhas) com rendimento de 14%.

O extrato aquoso da casca foi preparado por decocção, para isso 100g do material vegetal pulverizado esteve em fervura com 1 L de água destilada em ebulição, por 10 minutos. Além disso, o extrato aquoso das folhas foi obtido pelo método de infusão, em que 100g da matriz vegetal ficou em contato por 20 minutos com 1 L de água destilada quente. Em seguida, as preparações aquosas foram filtradas em papel filtro com auxílio de funil, e os extratos levados para secagem em estufa (45°C) até peso constante (Brasil, 2023). Os processos de decocção e infusão geraram respectivamente: AEBAI (extrato aquoso da casca) com rendimento de 10%, e AELAI (extrato aquoso das folhas) com rendimento de 16%. A relação dos extratos e nomenclatura está presente na tabela 1.

Tabela 1 – Extratos produzidos a partir da casca e folhas de *A. leiocarpa*

Extrato	Código
Extrato etanólico da casca	EEBAI
Extrato aquoso da casca	AEBAI
Extrato etanólico das folhas	EELAI
Extrato aquoso das folhas	AELAI

4.3 Extração em fase sólida

O extrato EELAI foi processado em cartucho de fase sólida (SPE, Solid Phase Extract) para eliminação de interferentes. Nesse sentido, 10 mg de amostra foi solubilizada em 1 mL de H₂O/ACN (2:8, v/v) e sonicada em banho ultrassônico por 1 minuto, em seguida a solução foi carregada em um cartucho de SPE C18 previamente condicionado conforme fabricante. Posteriormente, o extrato tratado foi levado para secagem em estufa de ventilação a 45°C.

4.4 Análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa

Os experimentos de LC-MS foram conduzidos usando um espectrômetro de massa de alta resolução Xevo G2-S QToF (Waters Corp., Milford, MA, EUA) equipado com uma fonte Lockspray. A leucina-encefalina foi empregada como referência para medições precisas de massa. O software MassLynx 4.1 foi usado para controle do sistema e aquisição de dados. Cada extrato (2000 ppm) foi injetado (2 μ L) e separado em uma coluna BEH C18 (Waters Corp; 50 mm; 2,1 mm; tamanho de partícula 1,7 μ m) a 40 °C. Os extratos foram analisados separadamente cada um em triplicata experimental, utilizando como padrão positivo rotina e o branco apenas solventes. Água ultrapura (A) e acetonitrila grau LC-MS da Merck (Darmstadt, HE, Alemanha) (B) foram usadas como fase móvel. A taxa de fluxo foi de 300 μ L/min e o tempo total de execução foi de 24 minutos com o seguinte gradiente: 0–18 minutos (gradiente linear de 10% a 100% B), 19–20 minutos (limpeza da coluna), 21–23 minutos (redução linear de 100% para 10% B) e 24 minutos (mantido a 10% B durante 1 minuto para equilíbrio da coluna). A ionização negativa (IN) foi usada para aquisição de dados na faixa de massa de m/z 50 a 2000. A Aquisição Dependente de Dados (DDA) foi aplicada com uma forma de centróide e a seleção de cinco íons (Experiência Top 5). A energia de colisão foi ajustada de 15 a 65 eV. O tempo de varredura foi de 0,1 s e os estados de carga foram +2, com uma janela de tolerância de $\pm 0,2$ Da e uma tolerância de extração de pico de 2 Da. A tolerância ao deisótopo foi de ± 3 Da e a tolerância à extração do deisótopo foi de 6 Da. As temperaturas de fonte e dessolvatação foram fixadas em 150 °C e 300 °C, respectivamente. As vazões do cone e do gás de dessolvatação foram de 50 L/h e 800 L/h, respectivamente. A voltagem capilar foi de 3,0 kV e a voltagem do cone foi de 40 V.

4.5 Processamento dos dados

Os arquivos obtidos do espectrômetro de massa Xevo G2-S QToF para todos os extratos foram convertidos para o formato mzML usando o software MSConvert (ProteoWizard, Palo Alto, CA, EUA) (Chambers *et al.*, 2012). Os dados foram processados com o software MZmine, versão 4.0 (Schmid *et al.*, 2023). Os limites para o precursor e os fragmentos foram $1,0 \times 10^3$ (MS^1) e $8,0 \times 10^1$ (MS^2) 1. O algoritmo ADAP foi aplicado para construir os cromatogramas de íons totais (TICs). O tempo de retenção foi de 0,02 a 10,00 minutos, o tamanho mínimo do grupo foi definido para pelo menos 3, o limite de intensidade do grupo em $1,0 \times 10^3$, a máxima intensidade mínima em $3,0 \times 10^4$ e a precisão dos scanners 0,0020 m/z ou 10,0000 ppm.

O algoritmo Local Minimum Resolver foi usado para deconvoluir o cromatograma, em que o limiar cromatográfico foi fixado em 80%, o intervalo mínimo de pesquisa entre o tempo de retenção/mobilidade foi de 0,050, a tolerância de precursor foi 0,0020 m/z ou 10,0000 ppm, o limiar de ruído utilizado foi 15, a altura mínima absoluta foi de 10.000 e o rácio pico topo/borda foi de 1,7, a faixa de duração de pico 0,10 a 1,00 e a faixa de ondaleta (RT) foi de 0,05 até 0,15.

Os isótopos foram detectados usando uma janela de pico com tolerância de 0,0020 m/z ou 10,0 ppm, tolerância de tempo de retenção de 0,2 minutos e carga máxima de 2. Para o alinhamento de pico, foi usada a tolerância de m/z de 3:1 por tempo de retenção, tempo de retenção 0,2 minutos. A lista resultante foi filtrada para remover duplicatas e linhas sem MS^2 associado espectro. Os arquivos mgf e CSV foram exportados para pesquisa de biblioteca e análise de redes moleculares na plataforma GNPS (Wang *et al.*, 2016).

4.6 Análise da rede molecular

A análise da rede molecular foi conduzida no modo de ionização negativa com as seguintes configurações: para o agrupamento de espectros, a tolerância m/z para o íon precursor foi ajustada para 0,02 Da, e para o íon fragmento ajuste de 0,02 Da. A pontuação mínima de cosseno está acima de 0,7 e o número mínimo de íons de fragmento é definido em 4. Para pesquisar os espectros experimentais contra as bibliotecas espectrais GNPS MS/MS, uma pontuação mínima de cosseno acima de 0,7 e um mínimo de 4 combinações de íons de fragmento foram aplicadas. Metadados também foram usados para descrever as informações de quantidade relativa de íons nos extratos de *A. leiocarpa* (job de ionização negativa <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=b1d9e21d146b44b89267dd3d72b7f9cf>). Os resultados foram visualizados e avaliados usando Cytoscape versão 3.10.2. (Shannon *et al.*, 2003).

4.7 Análise antiviral dos extratos

As análises para avaliar a atividade antiviral, assim como a citotoxicidade, dos extratos estudados foram realizados em parceria com a Universidade Federal de Ouro Preto, com orientação da Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães.

4.7.1 LINHAGENS DE CÉLULAS, VÍRUS E EXTRATOS

Para realizar a avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral dos extratos foram empregadas as células de linhagem contínua vero (ATCC CCL-81). Essa linhagem celular é derivada de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), característica de fibroblastos e obtidas originalmente do banco de células

American Type Culture Collection (ATCC; EUA). As células Vero foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² utilizando meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco, com alta concentração de glicose (DMEM HG; Sigma-Aldrich, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, EUA) e um coquetel dos antimicrobianos usuais: estreptomicina (100µg/mL; Sigma-Aldrich, EUA), penicilina potássica (100U/mL; Sigma-Aldrich, EUA) e anfotericina B (2,5µg/mL; Sigma-Aldrich, EUA). O cultivo celular foi executado conforme indicado pela ATCC (2022), sendo a cultura subcultivada a cada 2-3 dias e mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, com atmosfera umidificada.

Os extratos analisados EEBAI, EELAI, AEBAI e AELAI foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) puro, a fim de que a solução estoque se encontrasse a 30 mg/mL. Após a diluição, estes foram armazenados em freezer -20°C até o momento de uso. No ensaio de atividade antiviral os compostos foram avaliados frente a quatro arbovírus de circulação no Brasil e de grande relevância na saúde pública, sendo eles os vírus Mayaro, Chikungunya, Zika e Oropouche.

O MAYV, cepa Acre27 (GenBank KM400591), utilizado na investigação foi originalmente isolado em junho de 2004 durante uma pesquisa epidemiológica a partir de amostra de sangue de uma paciente febril e malária negativo de Acrelândia – Bacia Amazônica, Acre, Brasil (Terzian *et al.*, 2015). O CHIKV, cepa S27-african (GenBank AF369024), foi inicialmente isolado de um paciente febril e é o protótipo do genótipo africano (Khan *et al.*, 2002). A amostra de ZIKV, cepa PE243/2015 (GenBank KX197192.1), foi originalmente obtida de um paciente no Estado de Pernambuco (Brasil) que apresentava sintomas clássicos da febre Zika, sem complicação neurológica, durante o surto de 2015 (Donald *et al.*, 2016). O OROV, cepa BeAn19991 (GenBank KP052850-KP052852), utilizado foi o protótipo do genótipo brasileiro, sendo isolado originalmente de uma “preguiça-de-bentinho” (*Bradypus tridactylus*) no Pará (Brasil) em 1960 (Saeed *et al.*, 2020).

4.7.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os extratos foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade, o qual determina a concentração de trabalho citotóxica para 50% das células (CC₅₀). Para confirmação dos resultados, os experimentos foram realizados em triplicata independente. As células foram implantadas em microplacas de 96 poços (5x10⁴ células/poço) e incubadas a 37°C *overnight*. Em seguida, o meio de manutenção das células foi removido e 200 µL/poço de meio DMEM suplementado com 1% de SFB foram adicionados nos poços destinados ao controle de células, condição sem tratamento, e 200 µL/poço de diferentes concentrações dos compostos diluídos em DMEM 1% SFB foram adicionados aos poços destinados a avaliação da citotoxicidade, em triplicata. A diluição dos extratos foi feita de forma seriada de 1:2. Foi adicionado DMSO nas mesmas proporções em que se encontrava nos extratos. Dessa forma, as placas seguiram para incubação a 37°C, por 48 horas (Ferraz *et al.*, 2019).

A análise de viabilidade celular após o tratamento foi realizada pelo método colorimétrico de MTT, no qual células viáveis são capazes de reduzir o MTT a cristais de formazan. Para isso, o meio das células foi removido e adicionados 25 µL da solução de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma-Aldrich, EUA) (1 mg/mL em PBS 1x), seguido de nova incubação a 37°C, por 90 minutos. Para que os cristais de formazan gerados pela metabolização do MTT fossem dissolvidos, foram adicionados 100 µL/poço do solvente DMSO e as microplacas mantidas sob agitação a 150 rpm por 15 minutos. Logo após, a absorbância de cada condição foi medida por espectrofotometria a $\lambda = 490$ nm no leitor de placas VictorX3.

A toxicidade celular foi expressa em termos de CC₅₀. Deste modo, para cada concentração testada de cada extrato, foi realizada a conversão da absorbância em porcentagem de células viáveis. A partir desses valores foi feita análise de regressão, usando o software Excel, para determinação da concentração que apresentava 50% das células viáveis (CC₅₀). A conversão da absorbância em porcentagem de células viáveis (1) é calculada na medida em que A é a absorbância a 490 nm dos poços com células não tratadas (controle) e B a absorbância com células tratadas.

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{B \times 100}{A} \quad (1)$$

4.7.3 TESTES DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os extratos foram avaliados quanto à atividade antiviral frente aos arbovírus MAYV, CHIKV, ZIKV e OROV, a partir das concentrações que não apresentaram alteração na viabilidade celular no ensaio de citotoxicidade realizado previamente. Os ensaios foram realizados em triplicata. A diluição dos extratos foi feita de forma seriada de 1:2. Dessa forma, as placas seguiram para incubação a 37°C, por 48 horas para os vírus MAYV, CHIKV e OROV e 72 horas para o ZIKV. A análise da viabilidade celular após a incubação foi feita utilizando a mesma técnica colorimétrica com MTT (Silva *et al.*, 2020).

Para isso, células Vero foram implantadas em microplacas de 96 poços (5x10⁴ células/poço) e incubadas a 37°C *overnight*. Em seguida, o meio de manutenção das células foi removido e 200 µL/poço de meio DMEM 1% SFB foram adicionados nos poços destinados ao controle de células, condição sem infecção e sem tratamento. Já nos poços destinados ao controle da infecção, 100 µL de meio DMEM 1% SFB foram adicionados juntamente com 100 µL de suspensão viral em uma multiplicidade de infecção de 1 (MOI 1, proporção de um vírus para cada célula), sendo a condição de infecção sem tratamento. Para condição de infecção e tratamento foram adicionados 100 µL/poço de diferentes concentrações dos compostos diluídos em DMEM 1% SFB juntamente com 100 µL de suspensão viral (moi 1).

A concentração eficaz com 50% de efeito antiviral (CE₅₀) foi expressa como a concentração que promoveu a proteção de 50% das células infectadas quando comparadas ao controle de infecção (sem tratamento), também calculada por meio de análise de regressão pelo software Excel, no qual a porcentagem de células viáveis foi determinada pela equação (2) em que A, B e C representam as absorbâncias a 490 nm dos poços de células infectadas e tratadas, infectadas e não tratadas (controle infecção), e não tratadas e não infectadas (controle), respectivamente.

$$\% \text{ de células viáveis} = \left(\frac{A-B}{C-B} \right) \times 100 \quad (2)$$

O índice de seletividade (IS) foi calculado para determinar se os compostos que apresentaram atividade antiviral são seletivos. O IS (3) expressa a razão entre a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) e a concentração eficaz que inibe 50% da infecção viral (CE₅₀). O IS é um parâmetro importante de ser mensurado pois fornece informações sobre a segurança dos candidatos a antimicrobianos, ele é considerado a janela terapêutica entre a dose efetiva e a dose citotóxica do extrato em estudo, a relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos, o quanto o composto é ativo contra o patógeno sem causar danos às células. Assim, quanto maior o IS, maior a chance do candidato antimicrobiano se mostrar seguro em fases posteriores de estudo clínico (Pritchett *et al.*, 2014).

$$IS = \frac{CC_{50}}{CE_{50}} \quad (3)$$

5 RESULTADOS

5.1 Anotação de compostos

As análises por LC-MS/MS dos extratos etanólicos e aquosos das folhas e casca do caule de *A. leiocarpa*, permitiram obter anotação de 30 compostos, dos quais, 22 (incluindo isômeros) referem-se a combinações válidas de espectros experimentais contras espectros de referência disponíveis na plataforma GNPS (<https://gnps2.org/>), e 08 correspondem a anotações baseados na análise de MS/MS e estudos anteriores da espécie na literatura. A eluição cromatográfica e ionização relativa desses metabólitos são apresentadas nos cromatogramas de íons totais (Figura 6).

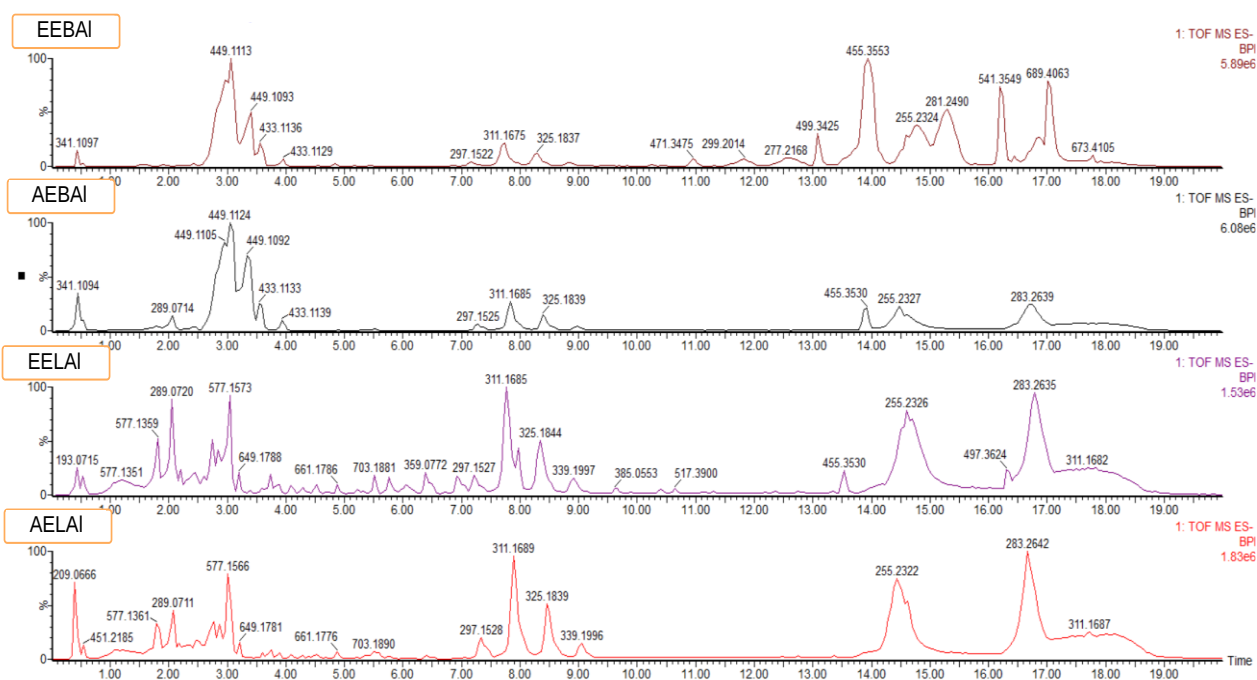


Figura 6 - Cromatogramas de íons totais dos extratos EEBAI, AEBAI, EELAI e AELAI.

Além disso, dados espectrométricos que auxiliaram na caracterização dos metabólitos citados anteriormente, como fórmula molecular, razão massa/carga (m/z) teórica e experimental, erro de massa (ppm), fragmentos (MS/MS) e nome putativo dos compostos são apresentados na tabela 2. Neste estudo foram anotados 30 compostos, dentre estes 4 proantocianidinas, 1 flavan-3-ol, 8 flavonas, 3 flavanonas, 10 flavonóis metoxilados e 4 terpenóides.

Tabela 2 - Anotação dos compostos dos extratos etanólicos e aquosos da folha e casca do caule de *A. leiocarpa*.

Nº	TR (min)	Fórmula Molecular	(M-H) ⁻ (m/z)	Experimental	Teórica	Erro (ppm)	Fragmentos MS/MS	Nome putativo	Referência	Extrato (maior concentração)
<i>Proantocianidinas</i>										
1	0,57	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	(M-H) ⁻	577,1353	577,1346	1,21	125, 161, 205, 245, 289, 339, 407, 425	procianidina B1	CCMSLIB00012176075	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
2	1,16	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	(M-H) ⁻	577,1349	577,1346	0,51	125, 161, 203, 245, 289, 407, 425, 451	procianidina B2	CCMSLIB00000222141	EELAI AEBAI AELAI
3	1,78	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	(M-H) ⁻	865,1993	865,1980	1,50	125, 243, 287, 289, 407, 425, 575, 695	procianidina C	CCMSLIB00010128636	EELAI AEBAI AELAI
5	2,18	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	(M-H) ⁻	865,1995	865,1980	1,73	125, 243, 287, 289, 407, 425, 575, 695, 713	procianidina C1	CCMSLIB00012079549	EELAI AEBAI AELAI
<i>Flavan-3-ol</i>										
4	2,10	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(2M-H) ⁻	579,1494	579,1503	1,55	109, 125, 151, 179, 203, 205, 221, 245	(epi)catequina	CCMSLIB00011430118	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
<i>Flavonas</i>										
6	2,43	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	(M-H) ⁻	447,0930	447,0927	0,67	133, 163, 175, 285, 297, 311, 327, 339, 357, 429	homoorientina	CCMSLIB00004696807	EEBAI EELAI AELAI
7	2,71	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	(M-H) ⁻	563,1402	563,1401	0,17	293, 311, 323, 413, 431	isovitexina 2-O-arabinosídeo	CCMSLIB00000846353	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
8	2,87	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	(M-H) ⁻	431,0978	431,0978	0	269, 283, 311, 323, 341	isovitexina	CCMSLIB00004696020	EEBAI

										EEBAI AEBAI AELAI
9	2,99	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	(M-H) ⁻	591,1711	591,1714	0,50	283, 295, 324, 325, 427, 445, 471	2"-O-ramnosil swertisina	CCMSLIB00000077222	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
13	4,84	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	(M-H) ⁻	285,0393	285,0399	2,10	107, 133, 151, 175, 199, 217, 241, 267	luteolina	CCMSLIB00004691240	EEBAI AEBAI
15	5,83	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	(M-H) ⁻	285,0400	285,0399	0,35	151, 199, 217, 241, 257	(iso)luteolina	CCMSLIB00004691240	EEBAI AEBAI
21	7,23	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	(M-H) ⁻	343,0815	343,0818	0,87	226, 242, 270, 285, 298, 313, 328	eupatilina	CCMSLIB00004683815	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
24	8,09	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	(M-H) ⁻	313,0710	313,0712	0,63	255, 270, 283, 298	velutina	CCMSLIB00005777937	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
<i>Flavanonas</i>										
10	3,07	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	(M-H) ⁻	449,1098	449,1084	3,11	107, 125, 151, 285, 303	(neo)astilbina	CCMSLIB00004707540	EEBAI AEBAI
11	3,17	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	(2M-H) ⁻	899,2274	899,2246	3,11	107, 125, 151, 285, 303	astilbina	CCMSLIB00003136267	EEBAI AEBAI
12	3,38	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	(M-H) ⁻	449,1090	449,1084	1,33	107, 125, 151, 285, 303	(iso)astilbina	CCMSLIB00004707540	EEBAI AEBAI

Flavonóis metoxilados

14	5,26	C ₁₉ H ₁₈ O ₉	(M-H) ⁻	389,0868	389,0873	1,28	153, 177, 183, 213, 241, 248, 285, 287, 315, 327, 341, 357, 359, 373, 375	5-O-desmetilapuleina	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EELAI AELAI
16	6,02	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	(M-H) ⁻	329,0659	329,0661	0,60	199, 243, 271, 299, 314	4',5,7-tri-hidroxi-3,6- dimetoxiflavona	CCMSLIB00004718271	EEBAI EELAI AELAI
17	6,18	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	(M-H) ⁻	403,1024	403,1029	1,24	165, 211, 271, 298, 315, 327, 341, 373	apuleina	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EELAI AELAI
18	6,35	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	(M-H)	373,0926	373,0923	0,80	165, 207, 287, 297, 315, 326, 343, 358	5-O-metiloxiaianina A	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EEBAI EELAI AELAI
19	6,38	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	(M-H) ⁻	359,0763	359,0767	1,11	258, 286, 301, 312, 314, 329, 344	jaceidina	CCMSLIB00004718287	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
20	6,71	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	(M-H) ⁻	359,0756	359,0767	3,06	299, 312, 314, 327, 344	apuleidina	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
22	7,58	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	(M-H) ⁻	359,0760	359,0767	1,94	221, 243, 267, 289, 299, 311, 327, 344	oxiaianina A	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
23	7,69	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	(M-H) ⁻	373,0917	373,0923	1,60	257, 285, 300, 315, 328, 343, 358	crisosplenetina	CCMSLIB00005724488	EEBAI EELAI AEBAI AELAI
25	8,58	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	(M-H) ⁻	403,1035	403,1029	1,48	216, 231, 255, 271, 287, 298, 315, 327	apuleirina	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EELAI AELAI

26	8,59	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	(M-H) ⁻	343,0813	343,0818	1,45	186, 198, 214, 226, 242, 254, 270, 298	aianina	Braz Filho e Gottlieb (1971)	EEBAI EELAI AELAI
<i>Triterpenóides</i>										
27	13,75	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	(M-H) ⁻	617,3846	617,3842	0,64	117, 133, 145, 161, 423, 439, 455, 573	ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil	CCMSLIB00003740028	EEBAI EELAI AEBAI
28	13,94	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	(M-H) ⁻	455,3529	455,3525	0,87	207, 391, 407, 437	ácido betulínico	Azevedo <i>et al.</i> (2024)	EEBAI EELAI AEBAI
29	15,38	C ₃₉ H ₅₆ O ₅	(M-H) ⁻	603,4057	603,4049	1,32	133, 135, 161, 179	3-o-cafeoil-betulina	CCMSLIB00011906774	EEBAI
30	15,75	C ₃₉ H ₅₆ O ₅	(M-H) ⁻	603,4048	603,4049	0,16	133, 135, 161, 179	isômero 3-o-cafeoil-betulina	CCMSLIB00011906774	EEBAI

A caracterização dos compostos foi realizada com base em dois fatores: (1) alta similaridade entre espectro experimental adquirido neste estudo e espectros de referência recuperados das bibliotecas que compõem o GNPS; (2) pesquisa na literatura dos principais fragmentos observados nos respectivos espectros MS/MS.

Os compostos **1** (m/z 577.1353) e o **2** (m/z 577.1349) foram caracterizados como isômeros de procianidina B. Ambos apresentaram fragmentos de m/z 125, 161, 205, 245, 289, 339, 407, 425 (Tabela 2). De acordo com a proposta de fragmentação proposta para ambos (figura 7), o fragmento de m/z 425 refere-se a uma fissão Retro-Diels-Alder (RDA) no anel C do flavan-3-ol (-152 Da), seguida por uma perda de água (18 Da), comum nesta subclasse de flavonóide, formando o fragmento m/z 407. Por outro lado, o fragmento de m/z 289 refere-se a uma unidade terminal (epi)catequina, que é produzida através da reação QMupper, que permite a fissão interflavan-3-ols. Por último, o fragmento de m/z 125, chamado de trihidroxibenzoico é bastante comum e geralmente é produzido por perda do anel B e porção do anel C do flavan-3-ol. Ressalta-se que estes dados estão de acordo com Karonen *et al.* (2021) e Rush *et al.* (2018). Portanto, esses dados permitem racionalizar que os compostos **1** e **2** se referem a isômeros de procianidinas B, com diferenças estereoquímicas, e muito provavelmente referente a epímeros.

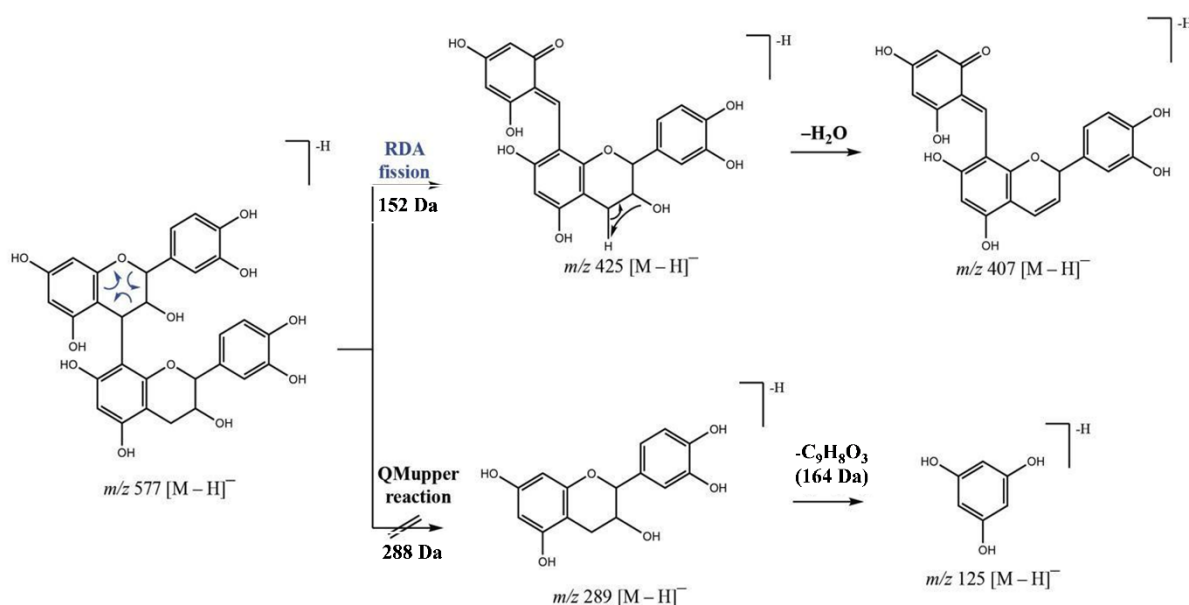


Figura 7 - Proposta de fragmentação para os isômeros de procianidina B (**1**, **2**).

As substâncias **3** e **5** (m/z 865.1993 e m/z 865.1995) apresentaram fragmentos de m/z 125, 287, 289, 407, 425, 575, 695. A proposta de fragmentação é ilustrada na Figura 8. O fragmento de m/z 695 é explicado por uma fissão RDA no anel C da primeira extensão do trímero, seguida por uma perda de H_2O . O fragmento de m/z 577 refere-se a clivagem da ligação interflavan-3-ol. Em seguida, o fragmento m/z 425 é proveniente de uma fissão RDA no anel C, que também pode perder H_2O e dar o fragmento de m/z 407. O fragmento de m/z 289 refere-se à unidade terminal (epi)catequina. Por fim, os fragmentos de m/z 287 pode ser produzido a partir do íon de m/z 577, através de uma reação QMupper já descrita anteriormente, e o fragmento de m/z 125 é o mesmo já discutido para os **1** e **2**. Estas propostas de fragmentação permitem supor os compostos **3** e **5** como isômeros de procianidina C (Callemien e Collin, 2008).

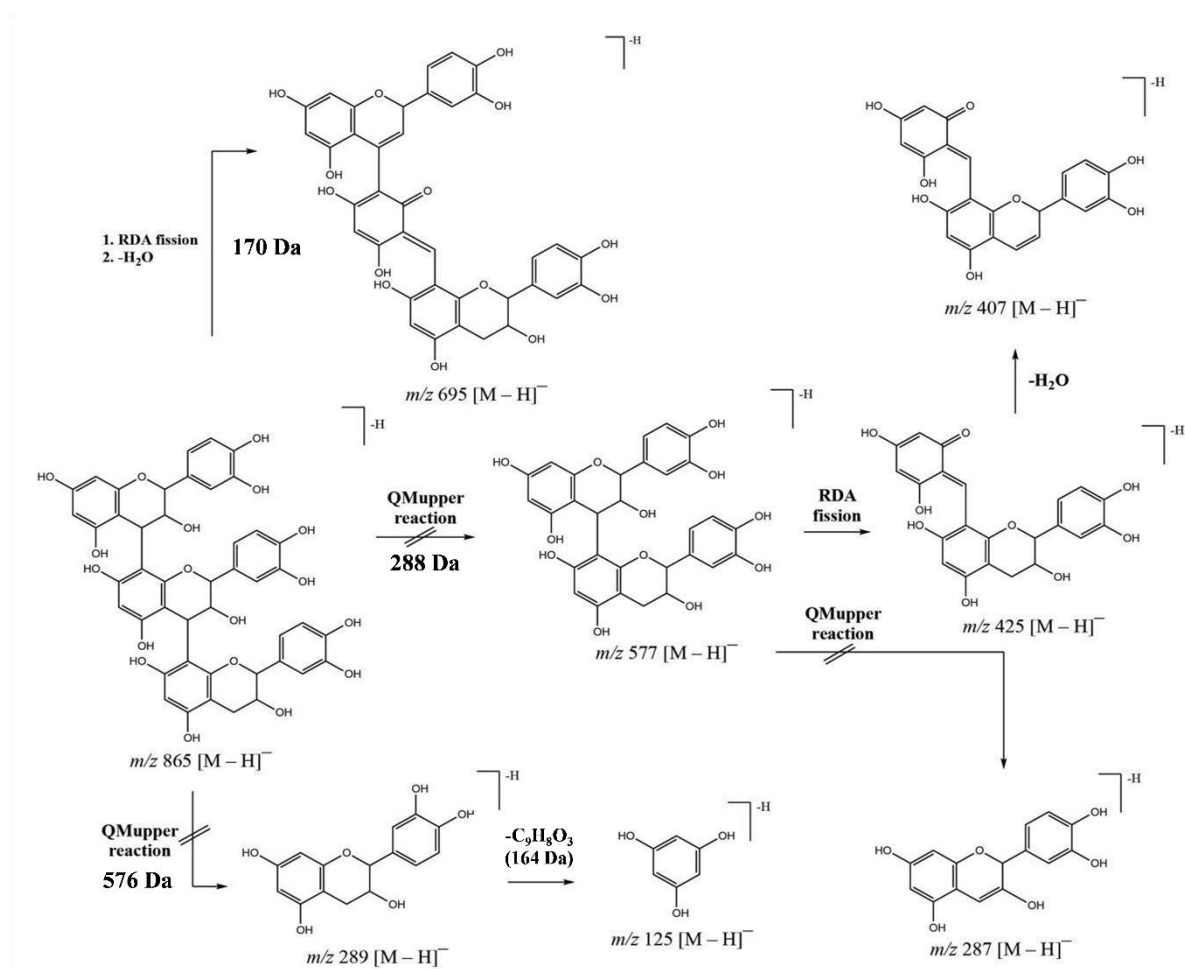


Figura 8 - Proposta de fragmentação para procianidina C (**3**, **5**).

O **4** (m/z 579.1494) foi caracterizado como (epi)catequina na forma dimerizada ($2M-H$)⁻. Este apresentou os fragmentos m/z 109, 125, 151, 179, 203, 205, 221, 245. A proposta de fragmentação apresentada na figura 9 racionaliza a hipótese que o fragmento m/z 245 corresponde a perda de C_2H_4O no anel C. O fragmento m/z 205 refere-se a clivagem no anel A com perda de $C_4H_4O_2$. O fragmento de m/z 179 resultou da perda de $C_6H_6O_2$. O fragmento de m/z 203 corresponde a perda de C_2H_2O através do fragmento de m/z 245. Neste sentido, é válido apresentar a anotação do composto como (epi)catequina (Šuković *et al.*, 2020; Mutungi *et al.*, 2021).

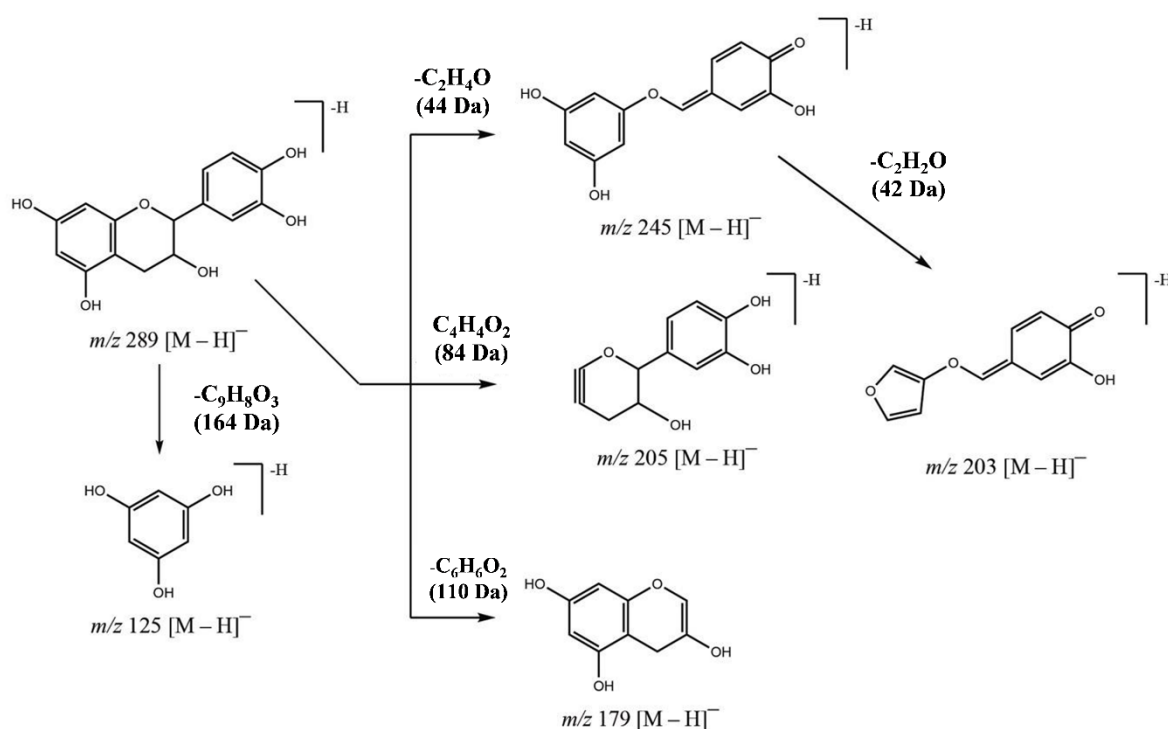


Figura 9 - Proposta de fragmentação para (epi)catequina (**4**).

O composto **6** (m/z 447.0930) fragmentou em m/z 133, 163, 175, 285, 297, 311, 327, 339, 357, 429. O fragmento m/z 429 corresponde a perda de uma molécula de água (18 Da). Os fragmentos 357 (-90 Da) e 327 (-120 Da) supostamente são referentes às clivagens em uma hexose. O fragmento m/z 285 pode ser derivado da perda total de uma hexose (162 Da). Portanto, este composto foi chamado de homoorientina (hidroxiflavona) (Keskes *et al.*, 2018; Marche *et al.*, 2006).

O composto **7** (m/z 563.1402) apresentou os fragmentos de m/z 293, 311, 323, 413, 431. Nesse sentido, o fragmento m/z 431 pode ser advindo pela perda de desoxiaçúcar ramnose (146 Da). O fragmento m/z 413 teoricamente é correspondente à perda de uma molécula de água (18 Da) do fragmento m/z 431. Dessa forma, com tais características de fragmentação, o composto **7** foi anotado como uma tri-hidroxiflavona chamada de isovitexina 2-O-arabinosídeo (Ferreira *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2011). O composto **8** (m/z 431.0978) apresentou os fragmentos m/z 269, 283, 311, 323, 341. O fragmento m/z 311 pode ser resultado de clivagem de parte de uma glicona (120 Da) e as frações posteriores podem estar envolvidas com as perdas de fração da aglicona. Em consulta na literatura dos fragmentos apresentados, m/z 431.0978 foi chamado de isovitexin (Shah *et al.*, 2022, Sheng *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2013).

A substância **9** (m/z 591.1711) fragmentou em m/z 283, 295, 324, 325, 427, 445, 471. O fragmento m/z 471 provavelmente é advindo da clivagem de parte de uma hexose (120 Da), assim como o fragmento m/z 445 resulta da cisão em outra posição da hexose (146 Da), este fragmento teoricamente corresponde ao composto swertisin (456 Da). O fragmento m/z 427 se refere a perda total de uma hexose (164 Da). O fragmento m/z 325 presumivelmente é proveniente da quebra de outro açúcar (120 Da). Desse modo, o **9** foi anotado como 2-O-rhamnosyl-swertisin (Colombo *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2021).

O **10** (m/z 449.1098), **11** (m/z 899.2274) e **12** (m/z 449.1090) apresentaram os fragmentos de m/z 107, 125, 151, 178, 285, 303. As vias de fragmentação sugeridas estão ilustradas na Figura 10. O fragmento de m/z 303 refere-se a perda de uma porção da hexose ($C_6H_{10}O_4$) (146 Da). O fragmento de m/z 285 resultou da perda total da hexose (164 Da), e justifica a presença da aglicona definida neste caso como uma flavanona devido a carbonila em C-4. O fragmento m/z 151 refere-se a perda de $C_{14}H_{16}O_7$ (298 Da) e explica a presença do anel A e C da flavanona. Outros fragmentos menores como de m/z 178, 125 e 107 estão de acordo com dados da literatura especializada (Chen, Lu e Zhao, 2014). Estas fragmentações são comuns nesta subclasse de flavonoide. Portanto, estes dados apoiam definir com ressalvas, que os compostos **10**, **11** e **12** correspondam a (neo)astilbina, astilbina e (iso)astilbina (Brito *et al.*, 2021). Obviamente, existem possibilidades de estereoisômeros como

neoisoastilbina, portanto, a definição real só é possível com uso de padrões destes quatro compostos ou pelo isolamento e elucidação total por experimentos (^1H e ^{13}C) de ressonância magnética nuclear.

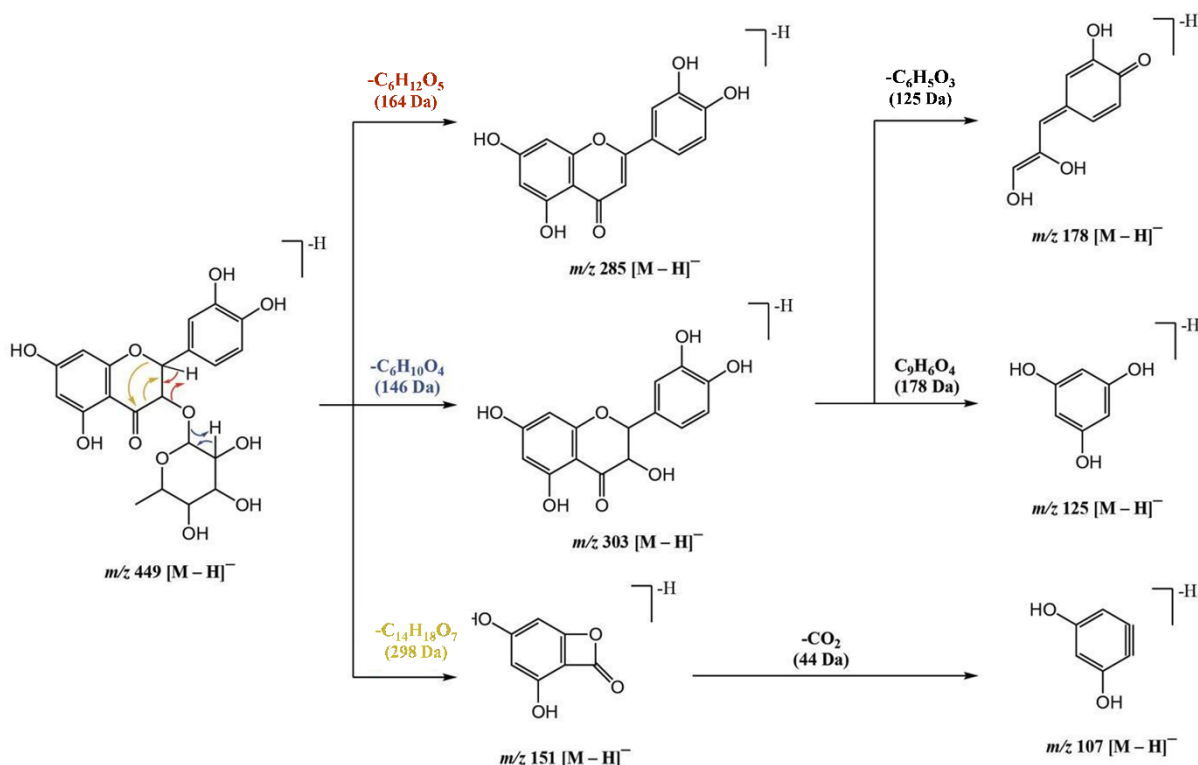


Figura 10 - Proposta de fragmentação para os isômeros de (neo)astilbina, astilbina e (iso)astilbina (**10**, **11** e **12**).

O composto **13** (m/z 285.0393) fragmentou em m/z 107, 133, 151, 175, 199, 217, 241 e 267, o composto **15** (m/z 285.0400) apresentou os fragmentos 151, 199, 217, 241, 257. As possibilidades de fragmentação dessas m/z envolvem quebras atribuídas a um anel C, por exemplo o fragmento m/z 267 pode ser formado a partir da perda de uma molécula de água (18 Da), o fragmento m/z 257 em resultado da saída de CO (28 Da), e m/z 241 devido da perda de CO_2 (44 Da). Em outra parte da molécula, no anel A, possivelmente ocorre cisões que originam m/z 217 por perda de C_3O_2 (68 Da), em sequência, a partir desse fragmento, há perda de $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ (110 Da) formando o fragmento m/z 175. Os fragmentos m/z 151 e m/z 133 provavelmente correspondem a quebra da molécula por fissão retro-Diels-Alder (RDA) no anel C.

Nesse sentido, com todas essas características de fragmentação, os compostos **13** e **15** foram nomeados como os isômeros luteolina e (iso)luteolina, respectivamente (Maoloni *et al.*, 2023; Śliwka-Kaszyńska, Anusiewicz e Skurski, 2022).

O composto **14** (m/z 389.0868) foi anotado como 5-O-desmetilapuleina, o composto **17** (m/z 403.1024) foi nomeado de apuleina. O composto **25** (m/z 403.1035) foi anotado como apuleirina. Estes compostos foram anotados baseados no estudo de Braz Filho e Gottlieb (1971) que isolaram e relataram a presença de 5-O-desmetilapuleina, apuleina e apuleirina em *A. leiocarpa*.

O composto **16** (m/z 329.0659) apresentou os fragmentos m/z 199, 243, 271, 299, 314. Este composto foi previamente anotado com o nome 4',5,7-tri-hidroxi-3,6-dimetoxiflavona. O fragmento m/z 314 pode ser formado pela perda de CH_3 (15 Da). O fragmento m/z 299 talvez esteja relacionado a perda de 2CH_3 (30 Da). O fragmento m/z 271 pode ser resultado da perda de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (58 Da). Uma possível explicação para o fragmento m/z 243 é a perda de $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$ (86 Da), em seguida a perda de CO_2 (44 Da) do fragmento m/z 243 gera o fragmento m/z 199.

O composto **18** (m/z 373.0926) apresentou os fragmentos m/z 165, 207, 287, 297, 315, 326, 343, 358 e o composto **23** (m/z 373.0917) fragmentou em m/z 257, 285, 300, 315, 328, 343, 358. O fragmento m/z 358 pode ter origem a partir da perda CH_3 (15 Da). O fragmento m/z 343 provavelmente é derivado da perda de 2CH_3 (30 Da). O fragmento m/z 315 pode ser consequência da perda de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (58 Da). Dessa forma, os compostos **18** e **23** foram anotados como 5-O-metiloxiaianina A e crisosplenetina, respectivamente (Lephatsi *et al.*, 2023).

O composto **19** (m/z 359.0763) mostrou os íons fragmentos m/z 258, 286, 301, 312, 314, 329, 344, estando de acordo com os dados da literatura científica para anotação do composto jaceidin (Taamalli *et al.*, 2015). A substância **20** (m/z 359.0756) apresentou os fragmentos m/z 299, 312, 314, 327, 344. O composto **22** (m/z 359.0760) fragmentou em m/z 221, 243, 267, 289, 299, 311, 327, 344. Uma provável explicação para o fragmento m/z 344 é a perda de CH_3 (15 Da). Os compostos **20** e **22** estão sendo nomeados de apuleidina e oxiaianina A, estes isômeros foram isolados na espécie *A. leiocarpa* anteriormente (Braz Filho e Gottlieb, 1971).

O composto **21** (m/z 343.0815) apresentou os fragmentos m/z 226, 242, 270, 285, 298, 313, 328, e o composto **26** (m/z 343.0813) apresentou os íons fragmentos

m/z 186, 198, 214, 226, 242, 254, 270, 298. O fragmento m/z 328 provavelmente corresponde a perda de um grupo metil (CH_3 - 15 Da). O fragmento m/z 313 pode ser devido a perda de 2CH_3 (30 Da). A possibilidade da perda de 3CH_3 (45 Da) gera o fragmento m/z 298 nos compostos. O composto **21** foi anotado provisoriamente como eupatilina e o composto **26** foi nomeado de aianina, este último foi isolado na espécie em estudo anterior (Braz Filho e Gottlieb, 1971; Choi, Jung e Kim, 2015).

O composto **24** (m/z 313.0710) apresentou os fragmentos m/z 255, 270, 283, 298. A perda de CH_3 (15 Da) gera o fragmento m/z 298. Em seguida, a perda de dois grupos metil (2CH_3 - 30 Da) forma o fragmento m/z 283. Posteriormente, o fragmento m/z 255 pode ser resultado da perda de $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ (58 Da). Nesse contexto, o composto **24** foi nomeado de velutina (Eissa *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2016).

O composto **27** (m/z 617.3846) mostrou os fragmentos m/z 117, 133, 145, 161, 423, 439, 455, 573. O fragmento m/z 573 pode ser relacionado a perda de CO_2 (44 Da). O íon fragmento m/z 145 é relacionado a fração coumaroyl a partir da cisão da molécula (perda de 472 Da). Conforme informações de espectros da literatura, este composto (**27**) foi nomeado ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (Ceccacci *et al.*, 2021; Liao, Hu e Chen, 2019; Wu *et al.*, 2024).

O composto **28** (m/z 455.3529) apresentou os íons fragmentos m/z 207, 391, 407, 437. O fragmento m/z 437 está relacionado a perda de H_2O (18 Da), em seguida este perde CH_2O_2 (46 Da) formando o fragmento m/z 391. O íon m/z 407 é relatado devido a perda de CH_2O e H_2O (48 Da), enquanto o fragmento m/z 207 ($\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}$) correspondente à clivagem por reação retro-Diels-Alder (RDA) no anel C de uma molécula triterpênica. Devido a estas características e o relato em estudo anterior de *A. leiocarpa*, o composto **28** foi anotado como ácido betulínico (Ayatollahi *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2024; Ghiulai *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2023).

Os compostos **29** (m/z 603.4048) e **30** (m/z 603.4057), de tempos de retenção diferentes, apresentaram os fragmentos de m/z 133, 135, 161, 179. Estes fragmentos estão de acordo com análises em estudos existentes na literatura, apresentando características de compostos triterpenos, dessa forma se infere de estas m/z podem ser respectivamente denominadas de 3-o-cafeoil-betulina e isômero de 3-o-cafeoil-betulina (Strehmel, Strunk e Strehmel, 2017; Zhang *et al.*, 2022).

Estes compostos anotados podem ser representados pelo desenho das moléculas presentes na figura 11 e rede molecular observada na figura 12. Na figura 12, cada nodo representa um cluster de espectros MS/MS combinados e nodos conectados uns aos outros referem-se a famílias moleculares. Além disso, os nodos são representados por gráficos de pizza, em que ilustra a abundância relativa de cada metabólito nos extratos.

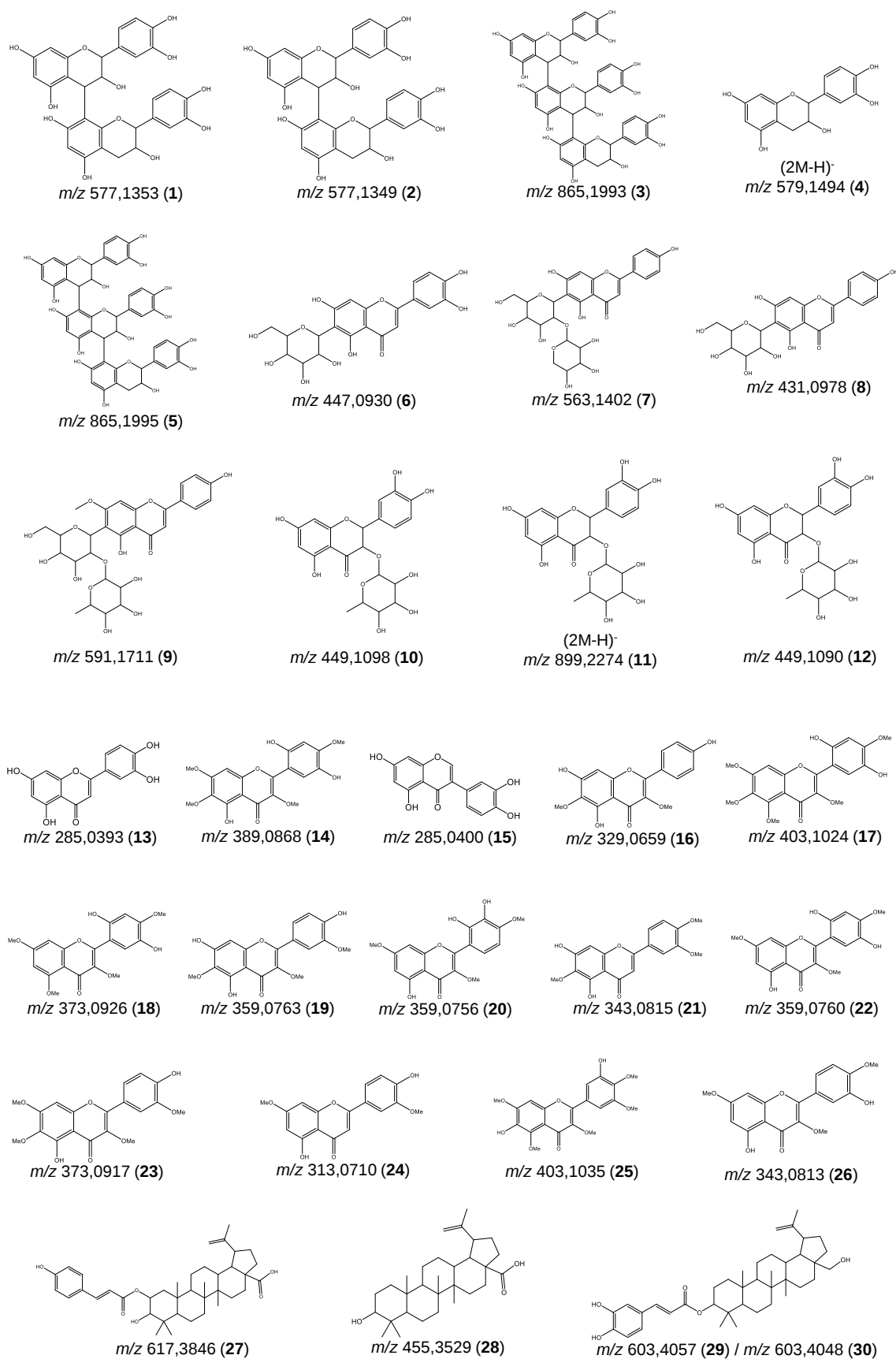


Figura 11 – Compostos anotados de forma suposta pela m/z , erro calculado e fragmentos MS/MS dos extratos etanólicos e aquosos da casca do caule e folhas de *A. leiocarpa*.

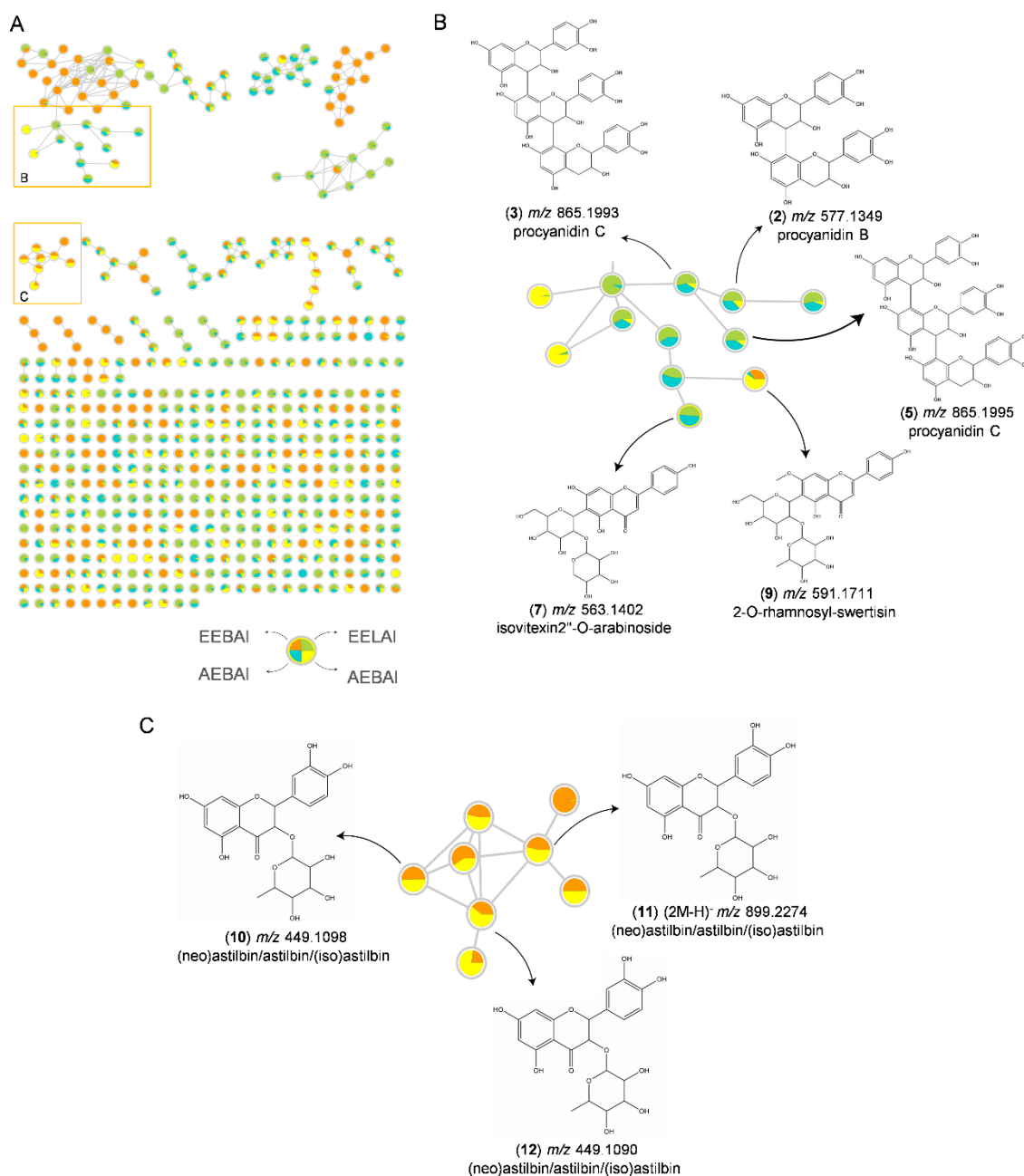


Figura 12 - Redes moleculares baseada na abundância relativa de metabólitos dos extratos etanólicos e aquosos das folhas e casca do caule de *A. leiocarpa*. (A) Redes moleculares produzidas com dados de espectrometria de massas tandem de ambos extratos de *A. leiocarpa*. (B) Rede de proantocianidinas e flavonas. (C) Rede molecular de flavanonas. Cada nodo representa um metabólito e as cores dos nodos denotam o tipo de extrato analisado. Em laranja está representado os metabólitos presentes no extrato etanólico da casca de *A. leiocarpa*, em amarelo está representado o extrato aquoso da casca, em verde está simbolizado o extrato etanólico das folhas, e em azul está descrito os metabólitos presentes no extrato aquoso das folhas de *A. leiocarpa*. As conexões entres dois nodos se baseiam na similaridade espectral dos compostos pareados.

5.2 Citotoxicidade dos extratos

O teste de citotoxicidade permitiu avaliar a concentração citotóxica (CC_{50}) dos extratos, isto é, a concentração capaz de reduzir 50% da viabilidade celular. O extrato EEBAI apresentou uma CC_{50} média de 764,45 e desvio padrão de 16,83, o AEBAI apresentou CC_{50} 706,61 com desvio padrão de 3,90. Por outro lado, EELAI e AELAI apresentaram concentração maior que 500, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores das concentrações citotóxicas (CC_{50}) apresentadas pelos extratos.

Citotoxicidade	
Extrato	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EEBAI	764,45 $\pm$ 16,83
EELAI	>500
AEBAI	706,61 $\pm$ 3,90
AELAI	>500

5.3 Atividades antivirais

A atividade antiviral foi avaliada através da concentração efetiva dos extratos em 50% das células (CE_{50}), bem como pelo índice de seletividade (IS), ambos valores são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações efetivas dos extratos em relação a 50% células infectadas e índice de seletividade dos extratos em relação às arboviroses (OROV, MAYV, CHIKV e ZIKV).

	Anti-OROV		Anti-MAYV		Anti-CHIKV		Anti-ZIKV	
Extrato	CE ₅₀ (µg/mL)	IS	CE ₅₀ (µg/mL)	IS	CE ₅₀ (µg/mL)	IS	CE ₅₀ (µg/mL)	IS
EEBAI	14,85±6,72	51,50	36,52±2,06	20,93	65,03±7,96	11,76	57,70±13,31	13,25
EELAI	82,20±8,10	6,08	77,13±7,76	6,48	97,13±15,91	5,15	99,82±2,97	5,01
AEBAI	95,04±4,46	7,44	SA	-	151,86±20,60	4,65	174,26±1,13	4,05
AELAI	45,53±1,71	10,98	97,66±20,05	5,12	172,86±26,45	2,89	89,46±9,09	5,59

SA: sem atividade

Na comparação das efetividades, os extratos etanólicos foram mais promissores que os extratos aquosos. A atividade de AELAI em inibição do OROV foi mais interessante do que a ação desse extrato com os demais vírus, para o OROV a CE₅₀ de 45,53 µg/mL e IS 10,98, o MAYV a CE₅₀ 97,66 µg/mL e IS 5,12, para o CHIKV demonstrou a CE₅₀ de 172,86 µg/mL e IS 2,89, e o ZIKV mostrou CE₅₀ 89,46µg/mL e IS 5,59. Entretanto, os resultados de AEBAI foram considerados menos efetivos diante dos outros extratos, pois foi inativo contra MAYV e precisou-se de maiores quantidades do extrato para encontrar as concentrações ativas frente aos demais vírus, como contra o OROV apresentou CE₅₀ de 95,04 µg/mL e IS 7,44, o CHIKV demonstrou CE₅₀ de 151,86 µg/mL e IS 4,65, e o ZIKV mostrou CE₅₀ 174,26 µg/mL e IS 4,05.

Ademais, o extrato EELAI apresentou CE₅₀ 82,20 e IS 6,08 para inibir células infectadas com OROV. Contra MAYV resultou em CE₅₀ de 77,13 e IS 6,48. Ainda, contra CHIKV apresentou CE₅₀ de 97,13 e IS 5,15. O extrato também apresentou CE₅₀ de 99,82 e IS 5,01 contra ZIKV, assim EELAI demonstrou maior capacidade antiviral que os extratos aquosos. Porém, o extrato EEBAI indicou resultados mais promissores, pois além de apresentarem altos índices de seletividade, baixas concentrações foram capazes de inibir os arbovírus nas células infectadas. Por exemplo, o EEBAI frente ao OROV mostrou CE₅₀ de 14,85 e IS 51,50. O mesmo extrato contra o MAYV apresentou CE₅₀ 36,52 e IS 20,93. Já em relação ao CHIKV o CE₅₀ foi 65,03 e IS 11,76. Contra ZIKV o CE₅₀ encontrado foi 57,70 e IS 13,25.

Devido a relevante efetividade antiviral apresentada por EEBAI, realizou-se uma análise metabolômica, comparando os perfis metabólicos dos diferentes extratos abordados neste estudo. Dessa forma, a figura 13a apresenta um mapa de calor da abundância de metabolitos nas amostras. O mapa de calor transparece as diferenças notáveis na abundância de metabolitos entre a casca do caule e folhas e os solventes de extração. Portanto, na análise do mapa de calor, o EEBAI parece bastante peculiar diante dos demais extratos, principalmente pela abundância dos compostos luteolina (**13**), (iso)luteolina (**15**), ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (**27**) e ácido betulínico (**28**) observada nos *boxplots* (figura 13b) dos metabólitos.

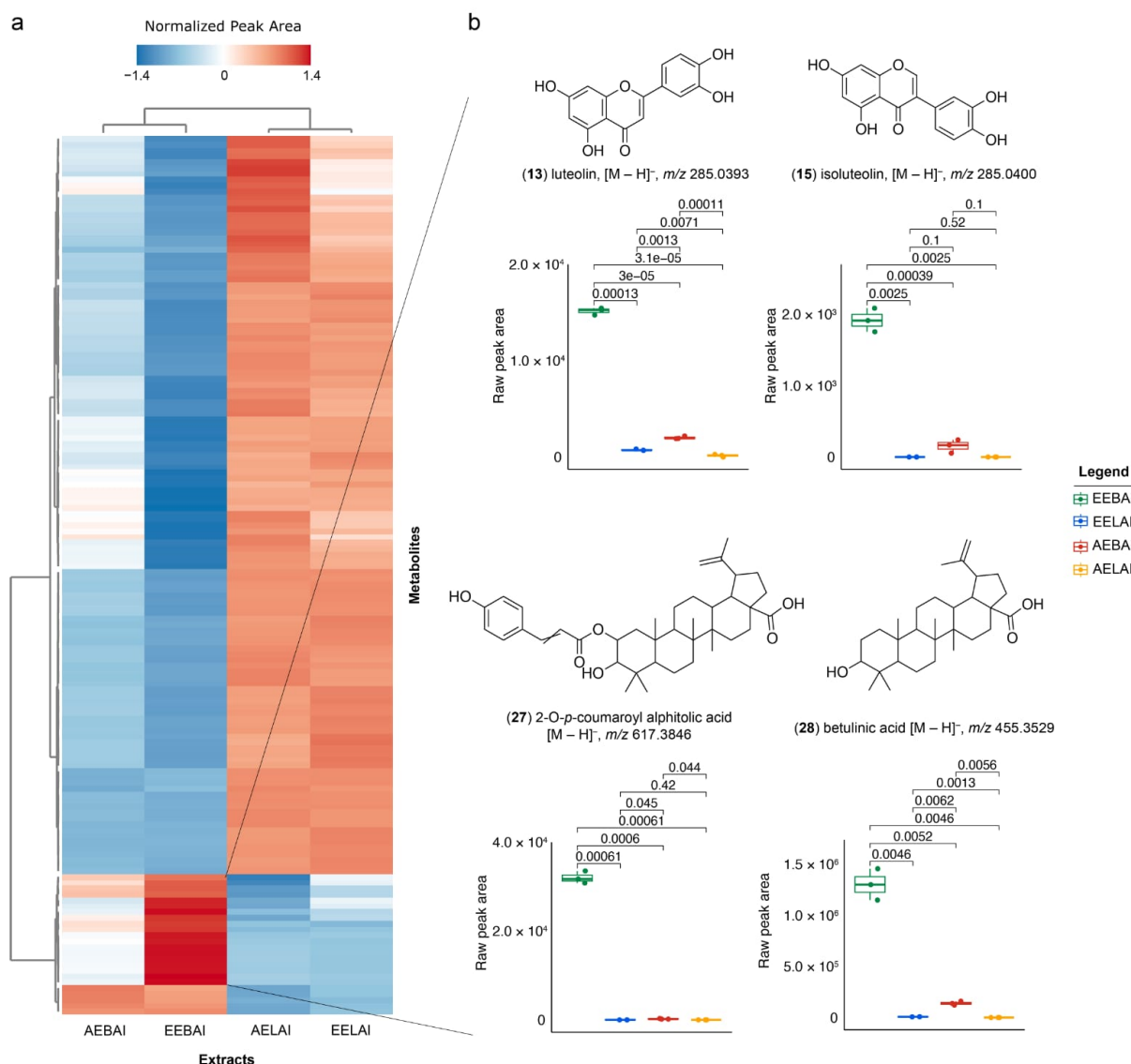


Figura 13 - Compostos em destaque do extrato etanólico da casca do caule. a) Mapa de calor dos 150 principais compostos (m/z) com pontuações VIP > 1,00 derivadas de modelos PLS-DA pareados. Cada linha corresponde a um metabolito específico, enquanto cada coluna representa os tipos de extrato. A intensidade das cores, que vai do azul (menor abundância) ao vermelho (maior abundância), está associada à área do pico bruto normalizado de cada metabolito. A biblioteca GNPS e dados da literatura científica foram usados para anotação de metabolitos. b) *Boxplots* de metabolitos com alta abundância relativa no extrato etanólico da casca do caule de *A. leiocarpa*. $p < 0,05$ indica uma diferença significativa entre as comparações.

6 DISCUSSÕES

A atividade antiviral dos extratos de *A. leiocarpa* revelou resultados promissores, com destaque para extrato etanólico da casca (EEBAI), que apresentou melhor atividade antiviral (CE_{50}) contra as diferentes linhagens de células infectadas em comparação aos demais extratos. Portanto, baixas concentrações de extratos foram necessárias para inibir ZIKV, MAYV, OROV e CHIKV nas células infectadas. Além disso, o índice de seletividade (IS) frente a todos os arbovírus testados são maiores que 10, em destaque contra o OROV em que o IS chega a 51,50. Dados da literatura ressaltam que um valor de IS maior que 10 pode ser descrito como seguro e com potencial para desenvolvimento de drogas (Bézivin *et al.*, 2003). O IS representa a correlação entre concentração citotóxica e concentração efetiva em 50% das células. Portanto, este é importante para avaliar substâncias efetivas e seguras em uma determinada janela terapêutica, auxiliando na seleção e desenvolvimento de novos fármacos (Ferraz *et al.*, 2019).

O uso de dados de LC-MS/MS associados às análises de rede molecular e consulta nas bibliotecas espectrais da plataforma GNPS possibilitou anotar 30 compostos dos extratos etanólicos e aquosos da casca e folha de *A. leiocarpa*. Em revisão de estudos da literatura científica, alguns dos compostos anotados foram apontados com atividade em alguns vírus e talvez possam ser associados com a atividade antiviral apresentada neste estudo. O EEBAI mostrou maior concentração dos compostos luteolina (**13**), (iso)luteolina (**15**), ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (**27**) e ácido betulínico (**28**) comparado aos demais extratos, conforme o mapa de calor apresentado na figura 13a e *boxplots* das *m/z* representadas na figura 13b. Estes compostos concentrados em EEBAI podem estar relacionados a atividade antiviral descoberta neste estudo.

A luteolina (**13**) e (iso)luteolina (**15**) estão sendo mencionados pela primeira vez em *A. leiocarpa*. Na literatura científica, a luteolina é relatada com atividade antiviral e mostrou ação *in vitro* contra o vírus chikungunya (CHIKV), com ação na redução da síntese de mRNA viral em células infectadas (Murali *et al.*, 2015). Estes isômeros (**13** e **15**) também possuem estudos que abordam atividade antiviral em outros tipos de viroses, como ação *in vitro* contra todos os sorotipos do vírus da dengue (DENV), em

que ocorre inibição de atividade enzimática de forma não competitiva impedindo a formação de vírions maduros infecciosos, também foi demonstrada atividade *in vivo* em camundongos infectados com DENV (Peng *et al.*, 2017). Além destes estudos mencionados, a luteolina também é relatada com ação contra SARS-CoV-2, vírus influenza, enterovírus, rotavírus, vírus herpes e vírus sincicial respiratório, entre outros (Lu *et al.*, 2023). Ademais, a (iso)luteolina apresenta estudos *in vitro* contra o vírus da hepatite C, vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 e rinovírus humano (Choi *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2018; Tewtrakul *et al.*, 2007).

O ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (**27**), anotado pela primeira vez na espécie estudada, não apresenta até o momento da escrita desse trabalho estudos que relatem atividade antiviral. Todavia, este composto possui relatos científicos de atividades *in vitro* testadas antiplasmodial em *Plasmodium falciparum* e antimicobacteriana contra cepas de *M. Tuberculosis* (Suksamrarn *et al.*, 2006).

O ácido betulínico (**28**) já foi relatado em *A. leiocarpa* por Azevedo *et al.* (2024) e Barra (2015), no presente estudo é anotado como um dos compostos majoritários do EEBAI, extrato mais ativo contra os arbovírus testados. A literatura científica apresenta vários estudos antivirais deste composto. Por exemplo, o ácido betulínico mostrou atividade *in vitro* contra DENV, CHIKV e ZIKV, especificamente em DENV o composto inibe um estágio pós-entrada do ciclo de replicação, inibe a síntese de RNA viral e a produção de proteínas (Loe *et al.*, 2020; Peyrat *et al.*, 2017). Além disso, o ácido betulínico e seus análogos apresentam atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Cichewicz e Kouzi, 2004; Zhao *et al.*, 2021). Ademais, este composto também demonstrou inibição nos vírus da hepatite B (HBV), hepatite D (HDV) e herpes simplex do tipo I e tipo II (Kirstgen *et al.*, 2020; Pavlova *et al.*, 2003; Visalli *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2009). Outro estudo aborda a ação neuroprotetora do ácido betulínico em células progenitoras neurais infectadas por ZIKV, dessa forma protegendo contra a morte celular induzida pelo vírus (Cavalcante *et al.*, 2020).

Em síntese, diante destes dados de atividade antiviral existentes na literatura, a luteolina (**13**), (iso)luteolina (**15**), ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (**27**) e ácido betulínico (**28**) podem agir em sinergismo, potencializando a atividade antiviral do EEBAI através de diferentes mecanismos de ação antiviral, ainda inexplorados,

desses compostos. Dessa forma, a luteolina (**13**), (iso)luteolina (**15**), 2-O-p-coumaroil (**27**) e ácido betulínico (**28**) parecem ser os compostos com maior potencial para explicar a atividade antiviral do EEBAI.

Os EELAI, AELAI e AEBAI também apresentaram atividade antiviral e os demais compostos anotados por LC-MS/MS podem ser relacionados. A procianidina B (**1**, **2**) (nos quais seus isômeros são relatados pela primeira vez em *A. leiocarpa*) já foi descrita na literatura com atividade de inibição da replicação *in silico* contra o vírus ebola (EBOV) e vírus influenza A (IAV) e B (IBV) (Tsang *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). Além disso, a procianidina B2 também já foi associada a atividade antiviral em herpes simples (HSV2) e em enterovírus coxsackie B (CVB3) (Rguez *et al.*, 2022). Adicionalmente, a procianidina C (**3**, **5**), relatada pela primeira vez em *A. leiocarpa*, não possui evidências de ação antiviral, mas a procianidina C2 é descrita na literatura com atividade anti-inflamatória, comumente relacionada a etapas iniciais de infecção viral (Byun *et al.*, 2013).

A (epi)catequina (**4**), descrita pela primeira vez em *A. leiocarpa*, possui estudos antivirais *in vitro* contra MAYV e contra vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). Em adição, a (epi)catequina parece estar relacionada na prevenção da infecção pelo vírus influenza A (IAV) e vírus ebola (EBOV) (Ferreira *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 1999; Onishi *et al.*, 2020; Tsang *et al.*, 2022). A homoorientina (**6**), também chamada isoorientina, é observada pela primeira vez na espécie. Este composto demonstrou resultado antiviral na literatura em ensaios *in silico*, em que interage com a fração RBD da proteína spike de variantes do pseudovírus SARS-CoV-2 e bloqueia a ligação do SARS-CoV-2 e da enzima conversora da angiotensina 2 (ECA2), dessa forma interferindo na entrada do vírus na célula (Chen *et al.*, 2023). Outros estudos *in vitro* apontam que a homoorientina apresenta atividade contra o vírus sincicial respiratório (VSR) (Chen *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2012).

A isovitexina 2"-O-arabinosídeo (**7**) e a isovitexina (**8**) estão sendo anotadas pela primeira vez na espécie. A isovitexina 2"-O-arabinosídeo não é relatada com atividade antiviral na literatura, porém está relacionada ao composto isovitexina, que exibiu atividade antiviral *in silico* contra o SARS-CoV-2 ao se ligar no receptor da ECA2 melhor que os medicamentos antivirais existentes, e por consequência prevenir a

entrada do vírus na célula. A isovitexina também foi ativa na inibição da replicação de DNA do vírus da hepatite B (HBV) (Cao *et al.*, 2013; Ferdausi *et al.*, 2022).

O composto 2"-O-ramnosil swertisina (**9**) está sendo observado pela primeira vez na espécie. Na literatura científica, este composto não é relacionado a atividade contra doenças virais, porém há estudos de modelo animal (*in vivo*) que concluem efeito antinociceptivo agindo no controle da dor persistente e crônica (Fernandes *et al.*, 2021; Quintão *et al.*, 2011; Quintão *et al.*, 2012; Quintão *et al.*, 2019). Ademais, 2"-O-ramnosil swertisina tem conexão com swertisina, que por sua vez apresenta ação *in vitro* e *in vivo* contra o vírus da hepatite B (HBV) (Xu *et al.*, 2020).

A (neo)astilbina (**10**), astilbina (**11**) e (iso)astilbina (**12**) são isômeros, e o composto astilbina já foi descrito na espécie (Barra, 2015) e possui uma gama de ações farmacológicas, com destaque para estudos relacionados ao sistema imunológico. Por exemplo, astilbina já possui estudo antiviral na literatura que indica a inibição de uma protease do SARS-CoV-2 (Zhang *et al.*, 2022). Outras propriedades como atividade antibacteriana, antioxidante e hepatoprotetora também já são descritas (Sharma *et al.*, 2020). Além disso, o isômero isoastilbina é associado à atividade antioxidante e anti-apoptótica (An *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2019).

A crisosplenetina (**23**) ainda não foi relatada na espécie. Esta substância é estudada para tratar infecções por enterovírus 71, em que exibiu ação inibindo a replicação do RNA viral (Dai *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2011). O composto velutina (**24**) está sendo anotado pela primeira vez na espécie. Este composto mostrou inibir *in vitro* o vírus da hepatite B (HBV) dependente da dose (Ahmed *et al.*, 2023). Além disso, a velutin apresenta atividade anti-inflamatória por inibir expressão de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, e também ação antimelanogênica (Brito *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2012). A aianina (**26**), isolada de *A. leiocarpa* por Braz Filho e Gottlieb (1971), mostrou resultados positivos contra o vírus sincicial respiratório (VSR), causador de infecções respiratórias em recém-nascidos e crianças pequenas (Mahambo *et al.*, 2023).

O composto 4',5,7-tri-hidroxi-3,6-dimetoxiflavona (**16**) é mencionado pela primeira vez na espécie, apresenta atividade contra *Leishmania amazonensis* (Mai *et al.*, 2015). A jaceidina (**19**) está sendo mencionada pela primeira vez em *A. leiocarpa*, e é relatada com atividade antitumoral *in vivo*, e também exibir citotoxicidade *in vitro*,

e encaixe molecular como inibidor seletivo da angiogênese *in silico* (Elhady *et al.*, 2020). Além disso, o derivado triacetato de jaceidina foi relatado com atividade inibidora na protease Mpro do SARS-CoV-2 (Lin *et al.*, 2023).

Os isômeros de 3-o-cafeoil-betulina (**29** e **30**) estão sendo sugeridos pela primeira vez na espécie. Além disso, o ácido betulínico 3 β -caffeato, um sinônimo dos compostos **29** e **30**, em estudos anteriores, exibiu inibição do vírus da dengue com $IC_{50} = 0,85 \pm 0,1 \mu M$ em ensaio de RNA polimerase de DENV, apresentando relevante atividade antiviral *in vitro* (Bourjot *et al.*, 2012).

A eupatilina (**21**) está sendo anotada pela primeira vez em *A. leiocarpa*. Este composto não possui relatos de atividade antiviral, porém tem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotetoras e cardioprotetoras (Nageen *et al.*, 2020).

A oxiaianina A (**22**) já foi isolada e relatada em *A. leiocarpa* (Braz Filho e Gottlieb, 1971), e essa substância possui atividade antitumoral (Arisawa *et al.*, 1995). Os compostos 5-O-desmetilapuleina (**14**), apuleina (**17**), 5-O-metiloxiaianina A (**18**), apuleidina (**20**) e apuleirina (**25**) foram isoladas em *A. leiocarpa* por Braz Filho e Gottlieb (1971), porém não há estudos relatando atividades biológicas desses compostos até o momento da escrita deste trabalho.

7 CONCLUSÃO

Em síntese, o presente estudo contribui com a anotação 30 compostos na espécie, dentre esses, 20 metabólitos foram anotados pela primeira vez, sem menções em estudos anteriores. Em análise dos compostos existentes nos extratos estudados foram anotados: proantocianidinas, flavan-3-ol, flavonas, flavanonas, flavonóis metoxilados e terpenóides. Nesse sentido, este estudo colabora na ampliação do conhecimento de metabólitos produzidos por *A. leiocarpa*. Na atividade antiviral apresentada, destaca-se principalmente a atividade contra OROV exibida pelo extrato etanólico da casca de *A. leiocarpa*. Esta ação antiviral está sendo relacionada aos compostos luteolina (**13**), (iso)luteolina (**15**), ácido alfitólico 2-O-p-coumaroil (**27**) e ácido betulínico (**28**) por estarem em concentração abundante no extrato etanólico da casca e apresentarem atividade antiviral relatada em estudos anteriores. Assim, supõe-se que os compostos mencionados, das classes dos flavonoides e triterpenoides, podem interagir de forma sinérgica no extrato etanólico da casca para efetuar a ação antiviral. O extrato etanólico da casca e os demais extratos etanólico das folhas, aquoso das folhas e aquoso da casca também mostraram atividade contra os arbovírus ZIKV, MAYV, OROV e CHIKV. Além disso, os compostos anotados exibem outras atividades biológicas relatadas, como anti-inflamatória e anticâncer. Dessa forma, todos os extratos de *A. leiocarpa* parecem relevantes, porém salientamos a importância de estudos que avancem o conhecimento principalmente sobre a atividade antiviral do extrato etanólico da casca.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, Vanessa Ochi *et al.* Natural and non-toxic products from Fabaceae Brazilian plants as a replacement for traditional antifouling biocides: an inhibition potential against initial biofouling. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 27112-27127, 2019.
- AHMED, Sarfaraz *et al.* Novel anti-hepatitis B virus flavonoids sakuranetin and velutin from *Rhus retinorrhoea*. **Molecular Medicine Reports**, v. 28, n. 3, p. 176, 2023.
- AL-KHAYRI, Jameel M. *et al.* Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2901, 2022.
- AN, Lifeng *et al.* Isoastilbin inhibits neuronal apoptosis and oxidative stress in a rat model of ischemia-reperfusion injury in the brain: Involvement of SIRT1/3/6. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 31, n. 1, p. 49-57, 2022.
- ANDREOLLA, Ana Paula *et al.* Mayaro virus: The state-of-the-art for antiviral drug development. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1787, 2022.
- ARISAWA, Munehisa *et al.* Inhibition of tumour-promoter-enhanced ^{32}P -incorporation into cellular phospholipids by flavonols from genus *Chrysosplenium*. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 3, p. 222-224, 1995.
- ARRUDA, D. P. **Avaliação da estabilidade e da atividade biológica de plantas amazônicas através de cromatografia em camada delgada de alta definição (HPTLC)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.
- AYATOLLAHI, Abdul Majid *et al.* Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 10, n. 2, p. 287, 2011.
- BARBOSA, Natalia S. *et al.* Oropouche virus glycoprotein topology and cellular requirements for glycoprotein secretion. **Journal of virology**, v. 97, n. 1, p. e01331-22, 2023.
- BARRA, I. M. M. **Estudo fitoquímico e atividade antiproliferativa de *Apuleia leiocarpa* (Fabaceae)**. 2015. 122 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.
- BARTHOLOMEEUSEN, Koen *et al.* Chikungunya fever. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 9, n. 1, p. 17, 2023.
- BÉZIVIN, C. *et al.* Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 499-503, 2003.

BOURJOT, Mélanie *et al.* Flacourtosides A–F, phenolic glycosides isolated from *Flacourtia ramontchi*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 752-758, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 6ª ed. Anvisa, v.1, 2023.

BRAZ FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. The flavones of *Apuleia leiocarpa*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 10, p. 2433–2450, 1971.

BRITO, Carlos *et al.* Cytotoxicity and potential anti-inflammatory activity of velutin on RAW 264.7 cell line differentiation: Implications in periodontal bone loss. **Archives of Oral Biology**, v. 83, p. 348-356, 2017.

BRITO, José Assis Gomes de *et al.* Chemophenetic significance of *Anomalocalyx uleanus* metabolites are revealed by dereplication using molecular networking tools. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 925, 2021.

BYUN, Eui-Baek *et al.* The procyanidin trimer C1 inhibits LPS-induced MAPK and NF- κ B signaling through TLR4 in macrophages. **International immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 450-456, 2013.

CALLEMIEN, Delphine; COLLIN, Sonia. Use of RP-HPLC-ESI (–)-MS/MS to differentiate various proanthocyanidin isomers in lager beer extracts. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 2, p. 109-115, 2008.

CAO, Tuan-Wu *et al.* Chemical constituents of *Swertia yunnanensis* and their anti-hepatitis B virus activity. **Fitoterapia**, v. 89, p. 175-182, 2013.

CARVALHO, Aline de Souza *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 8-402, 2015.

CARVALHO, Carlos AM *et al.* On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. **PeerJ**, v. 5, p. e3245, 2017.

CARVALHO, P. E. R. Grápia *Apuleia leiocarpa*. In: Espécies Arbóreas Brasileiras. 1ª ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 469-476, 2003. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/231705/1/Especies-Arboreas-Brasileiras-vol-1-Grapia.pdf>. Acesso em: 26 de dezembro de 2022.

CARVALHO, Vanessa L. *et al.* Arbovirus outbreak in a rural region of the Brazilian Amazon. **Journal of Clinical Virology**, v. 150, p. 105155, 2022.

CAVALCANTE, Bruno RR *et al.* Betulinic acid exerts cytoprotective activity on Zika virus-infected neural progenitor cells. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 558324, 2020.

CECCACCI, Sara *et al.* An oenothera biennis cell cultures extract endowed with skin anti-ageing activity improves cell mechanical properties. **Metabolites**, v. 11, n. 8, p. 527, 2021.

CICHEWICZ, Robert H.; KOUZI, Samir A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. **Medicinal research reviews**, v. 24, n. 1, p. 90-114, 2004.

CHAMBERS, Stuart M. *et al.* Combined small-molecule inhibition accelerates developmental timing and converts human pluripotent stem cells into nociceptors. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 715-720, 2012.

CHEN, Li-Feng *et al.* Antiviral activity of ethanol extract of *Lophatherum gracile* against respiratory syncytial virus infection. **Journal of ethnopharmacology**, v. 242, p. 111575, 2019.

CHEN, Shao-Dan; LU, Chuan-Jian; ZHAO, Rui-Zhi. Qualitative and quantitative analysis of *Rhizoma Smilacis glabrae* by ultra high performance liquid chromatography coupled with LTQ OrbitrapXL hybrid mass spectrometry. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10427-10439, 2014.

CHEN, Yu-Li *et al.* Anti-inflammatory and antiviral activities of flavone C-glycosides of *Lophatherum gracile* for COVID-19. **Journal of Functional Foods**, v. 101, p. 105407, 2023.

CHOI, H. J. *et al.* Inhibitory effects of orobol 7-O-d-glucoside from banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) on human rhinoviruses replication. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 1, p. 1-5, 2010.

CHOI, Yongsoo; JUNG, Yujung; KIM, Su-Nam. Identification of eupatilin from *Artemisia argyi* as a selective PPAR α agonist using affinity selection ultrafiltration LC-MS. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 13753-13763, 2015.

COFFEY, Lark L. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future microbiology**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.

COLOMBO, Renata *et al.* On-line identification of minor flavones from sugarcane juice by LC/UV/MS and post-column derivatization. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1574-1579, 2009.

CÔRTEZ, Nelson *et al.* Integrated control strategies for dengue, Zika, and Chikungunya virus infections. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1281667, 2023.

DAI, Wenwen *et al.* Antiviral efficacy of flavonoids against enterovirus 71 infection in vitro and in newborn mice. **Viruses**, v. 11, n. 7, p. 625, 2019.

DE LIMA CAVALCANTI, Thaise Yasmine Vasconcelos *et al.* A review on chikungunya virus epidemiology, pathogenesis and current vaccine development. **Viruses**, v. 14, n. 5, p. 969, 2022.

DE SOUSA, Filipe de Portugal ST; LEWIS, Gwilym P.; HAWKINS, Julie A. A revision of the South American genus *Apuleia* (Leguminosae, Cassieae). **Kew Bulletin**, v. 65, p. 225-232, 2010.

DE SOUZA SILVA, José Gabriel *et al.* Vegetative propagation of *Apuleia leiocarpa* (Vogel) JF Macbr. **Journal of Forestry Research**, v. 33, n. 2, p. 455-462, 2022.

DIAGNE, Cheikh Tidiane *et al.* Mayaro virus pathogenesis and transmission mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738, 2020.

DIAS, Helver Gonçalves *et al.* Retrospective molecular investigation of Mayaro and Oropouche viruses at the human-animal interface in West-central Brazil, 2016-2018. **Plos one**, v. 17, n. 11, p. e0277612, 2022.

DONALD, Claire L. *et al.* Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005048, 2016.

EISSA, Manar A. *et al.* Metabolite Profiling of *Aquilaria malaccensis* leaf extract using Liquid Chromatography-Q-TOF-Mass spectrometry and investigation of its potential antilipoxygenase activity in-vitro. **Processes**, v. 8, n. 2, p. 202, 2020.

ELHADY, Sameh S. *et al.* Jaceidin flavonoid isolated from *Chiliadenus montanus* attenuates tumor progression in mice via VEGF inhibition: *in vivo* and *in silico* studies. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 1031, 2020.

FALCÃO, Marcus JA *et al.* Development of inflorescences and flowers in Fabaceae subfamily Dialioideae: an evolutionary overview and complete ontogenetic series for *Apuleia* and *Martiodendron*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 193, n. 1, p. 19-46, 2020.

FERNANDES, Daniele Corrêa *et al.* *Echinodorus macrophyllus* fraction with a high level of flavonoid inhibits peripheral and central mechanisms of nociception. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 2022.

FERRAZ, Ariane Coelho *et al.* Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral research**, v. 168, p. 76-81, 2019.

FERRAZ, Ariane Coelho *et al.* Hepatoprotective, antioxidant, anti-inflammatory, and antiviral activities of silymarin against mayaro virus infection. **Antiviral Research**, v. 194, p. 105168, 2021.

FERREIRA, Priscila Gonçalves *et al.* Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein

C homology modelling and virtual screening. **Archives of virology**, v. 163, p. 1567-1576, 2018.

FERREIRA, Rafaela O. *et al.* Distribution of metabolites in galled and non-galled leaves of *Clusia lanceolata* and its antioxidant activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 617-625, 2014.

FILES, Megan A. *et al.* Baseline mapping of Oropouche virology, epidemiology, therapeutics, and vaccine research and development. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 38, 2022.

FERDAUSI, Nourin *et al.* Point-specific interactions of isovitexin with the neighboring amino acid residues of the hACE2 receptor as a targeted therapeutic agent in suppressing the SARS-CoV-2 influx mechanism. **Journal of advanced veterinary and animal research**, v. 9, n. 2, p. 230, 2022.

GHIULAI, Roxana *et al.* Structural Investigation of Betulinic Acid Plasma Metabolites by Tandem Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7359, 2022.

GIRALDO, Maria I.; GONZALEZ-OROZCO, Maria; RAJSBAUM, Ricardo. Pathogenesis of Zika virus infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, n. 1, p. 181-203, 2023.

HASSAN, Sherif TS *et al.* In vitro study of multi-therapeutic properties of *Thymus bovei* Benth. essential oil and its main component for promoting their use in clinical practice. **Journal of clinical medicine**, v. 7, n. 9, p. 283, 2018.

JUNG, Se-Hui *et al.* Anti-melanogenic properties of velutin and its analogs. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 3033, 2021.

KARONEN, Maarit *et al.* Characterization of natural and alkaline-oxidized proanthocyanidins in plant extracts by ultrahigh-resolution UHPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1873, 2021.

KESKES, Henda *et al.* LC-MS-MS and GC-MS analyses of biologically active extracts of Tunisian Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Seeds. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, p. 209-220, 2018.

KHAN, Afjal Hossain *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075-3084, 2002.

KHARWADKAR, Sahil; HERATH, Nipun. Clinical manifestations of dengue, Zika and chikungunya in the Pacific Islands: A systematic review and meta-analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 34, n. 2, p. e2521, 2024.

KIRSTGEN, Michael *et al.* Selective hepatitis B and D virus entry inhibitors from the group of pentacyclic lupane-type betulin-derived triterpenoids. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21772, 2020.

KWON, Eun-Bin *et al.* Antiviral activity of soybean GL 2626/96 (*Glycine max*) ethanolic extract against influenza A virus *in vitro* and *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, p. 113780, 2022.

KWON, Min Jung *et al.* Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 413-425, 2020.

LEE, Wei-Ping *et al.* Inhibitory effects of amentoflavone and orobol on daclatasvir-induced resistance-associated variants of hepatitis C virus. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 46, n. 04, p. 835-852, 2018.

LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **TAXON**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.

LEPHATSI, Motseoa Mariam *et al.* An integrated molecular networking and docking approach to characterize the metabolome of *Helichrysum splendidum* and its pharmaceutical potentials. **Metabolites**, v. 13, n. 10, p. 1104, 2023.

LIAO, Xiaoyan; HU, Fangli; CHEN, Zilin. A HPLC-MS method for profiling triterpenoid acids and triterpenoid esters in *Osmanthus fragrans* fruits. **Analyst**, v. 144, n. 23, p. 6981-6988, 2019.

LIN, Lin *et al.* Plant flavonoid inhibition of SARS-CoV-2 main protease and viral replication. **iScience**, v. 26, n. 9, 2023.

LIU, Siyi *et al.* Identification of metabolites of 6'-hydroxy-3, 4, 5, 2', 4'-pentamethoxychalcone in rats by a combination of ultra-high-performance liquid chromatography with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry based on multiple data processing techniques. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1266, 2016.

LIMA, William Gustavo *et al.* Animal venoms as a source of antiviral peptides active against arboviruses: A systematic review. **Archives of Virology**, v. 167, n. 9, p. 1763-1772, 2022.

LOE, Marcus Wing Choy *et al.* Betulinic acid exhibits antiviral effects against dengue virus infection. **Antiviral research**, v. 184, p. 104954, 2020.

LORENZ, Camila; RIBEIRO, Ana Freitas; CHIARAVALLLOTI-NETO, Francisco. Mayaro virus distribution in South America. **Acta tropica**, v. 198, p. 105093, 2019.

LU, Peng *et al.* A literature review on the antiviral mechanism of luteolin. **Natural Product Communications**, v. 18, n. 4, p. 1934578X231171521, 2023.

MA, Chaomei *et al.* Inhibitory effects of constituents from *Cynomorium songaricum* and related triterpene derivatives on HIV-1 protease. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 141-145, 1999.

MAI, Linh H. *et al.* Antivascular and anti-parasite activities of natural and hemisynthetic flavonoids from New Caledonian *Gardenia* species (Rubiaceae). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 93-100, 2015.

MAHAMBO, Emanuel T. *et al.* Crotofolane diterpenoids and other constituents isolated from *Croton kilwae*. **Journal of natural products**, v. 86, n. 2, p. 380-389, 2023.

MANTINIOTOU, Martha *et al.* Therapeutic Capabilities of Triterpenes and Triterpenoids in Immune and Inflammatory Processes: A Review. **Compounds**, v. 5, n. 1, p. 2, 2025.

MAOLONI, Antonietta *et al.* Characterization of potentially health-promoting constituents in sea fennel (*Crithmum maritimum*) cultivated in the Conero Natural Park (Marche region, Central Italy). **Pharmaceutical Biology**, v. 61, n. 1, p. 1030-1040, 2023.

MARCH, Raymond E. *et al.* A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 248, n. 1-2, p. 61-85, 2006.

MONTALVO ZURBIA-FLORES, Gerardo; REYES-SANDOVAL, Arturo; KIM, Young Chan. Chikungunya virus: priority pathogen or passing trend?. **Vaccines**, v. 11, n. 3, p. 568, 2023.

MUÑOZ, V. *et al.* A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 2, p. 127-137, 2000.

MURALI, Krishnan Saravana *et al.* Anti—chikungunya activity of luteolin and apigenin rich fraction from *Cynodon dactylon*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 352-358, 2015.

MUSARRA-PIZZO, Maria *et al.* Antiviral activity exerted by natural products against human viruses. **Viruses**, v. 13, n. 5, p. 828, 2021.

MUTUNGI, Moses Mutuse *et al.* Antioxidant and antiproliferative potentials of *Ficus glumosa* and Its Bioactive Polyphenol Metabolites. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 266, 2021.

NAGEEN, Bushra *et al.* Eupatilin: a natural pharmacologically active flavone compound with its wide range applications. **Journal of Asian natural products research**, v. 22, n. 1, p. 1-16, 2020.

ONISHI, Shintaro *et al.* Green tea catechins adsorbed on the murine pharyngeal mucosa reduce influenza A virus infection. **Journal of Functional Foods**, v. 68, p. 103894, 2020.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diretrizes para a Detecção e Vigilância de Oropouche em possíveis casos de infecção vertical, malformação congênita ou morte fetal. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/diretrizes-para-deteccao-e-vigilancia-oropouche-em-possiveis-casos-infeccao-vertical>. Acesso em: 20 de novembro de 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Epidemiological Update: Oropouche in the Americas Region, 15 October 2024. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2024. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-oropouche-americas-region-15-october-2024>. Acesso em: 20 de janeiro de 2025.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Weekly report - Chikungunya cases. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/chikv-en/550-chikv-weekly-en.html>. Acesso em: 20 de janeiro de 2025.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Weekly report - Zika cases. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika-weekly-en/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2025.

PAVLOVA, N. I. *et al.* Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 489-492, 2003.

PENG, Minhua *et al.* Luteolin restricts dengue virus replication through inhibition of the proprotein convertase furin. **Antiviral Research**, v. 143, p. 176-185, 2017.

PEYRAT, Laure-Anne *et al.* Betulinic Acid, the first lupane-type triterpenoid isolated from both a *Phomopsis* sp. and its host plant *Diospyros carbonaria* Benoist. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 1, p. e1600171, 2017.

PIELNAA, Paul *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34-42, 2020.

PRETORIUS, Chanel J. *et al.* Metabolomics for biomarker discovery: Key signatory metabolic profiles for the identification and discrimination of oat cultivars. **Metabolites**, v. 11, n. 3, p. 165, 2021.

PRITCHETT, J. C. *et al.* Chapter 19 - Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. In: FLAMAND, L. *et al.* Human Herpesviruses HHV-6A, HHV-6B & HHV-7. 3ª Edição. Elsevier, 2014, p. 311-331.

QUINTAO, Nara LM *et al.* *Aleurites moluccana* (L.) Willd. leaves: mechanical antinociceptive properties of a standardized dried extract and its chemical

markers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 1, p. 179890, 2011.

QUINTÃO, Nara LM *et al.* *Aleurites moluccana* and its main active ingredient, the flavonoid 2"-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 102, n. 2, p. 302-311, 2012.

QUINTÃO, Nara LM *et al.* *Aleurites moluccanus* and its main active constituent, the flavonoid 2"-O-rhamnosylswertisin, in experimental model of rheumatoid arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 248-254, 2019.

RAUTER, Amélia P. *et al.* Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). **Pure and Applied Chemistry**, v. 90, n. 9, p. 1429-1486, 2018.

RGUEZ, Safa *et al.* Bioguided fractionation of procyanidin B2 as potent anti coxsackie virus B and Herpes simplex from cypress (*Cupressus sempervirens* L.). **International Journal of Environmental Health Research**, v. 34, n. 1, p. 191-200, 2024.

ROMERO-ALVAREZ, Daniel *et al.* Transmission risk of Oropouche fever across the Americas. **Infectious diseases of poverty**, v. 12, n. 1, p. 47, 2023.

RUPPELT, Bettina M. *et al.* Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom: I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. suppl 2, p. 203-205, 1991.

RUSH, Michael D. *et al.* Rapid determination of procyanidins using MALDI-ToF/ToF mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11355-11361, 2018.

SAEED, Mohammad F. *et al.* Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 743-748, 2000.

SALMAN, A. K. D. *et al.* Espécies arbóreas nativas da Amazônia Ocidental Brasileira com potencial para arborização de pastagens. Embrapa Rondônia, p. 127, 2008. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/709707/1/doc127arborizacaod epastagens.pdf>. Acesso em: 02 de agosto de 2023.

SANTOS, Felipe RS *et al.* Identification of Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitors by structure-based virtual screening and drug repurposing approaches. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 731-737, 2020.

SCHMID, Robin *et al.* Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 447-449, 2023.

SHAH, Syed Luqman *et al.* LC-MS/MS-based metabolomic profiling of constituents from *Glochidion velutinum* and its activity against cancer cell lines. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 9012, 2022.

SHANNON, Paul *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SHARMA, Abhishek *et al.* Astilbin: A promising unexplored compound with multidimensional medicinal and health benefits. **Pharmacological Research**, v. 158, p. 104894, 2020.

SHENG, Ning *et al.* Pharmacokinetic and excretion study of three secoiridoid glycosides and three flavonoid glycosides in rat by LC–MS/MS after oral administration of the *Swertia pseudochinensis* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 967, p. 75-83, 2014.

SILVA, Laura Nunes *et al.* Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 3, p. 464-468, 2015.

SILVA, Tales Fernando *et al.* Antiviral effect of silymarin against Zika virus *in vitro*. **Acta Tropica**, v. 211, p. 105613, 2020.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. Porto Alegre, Artmed, 2017.

ŚLIWKA-KASZYŃSKA, Magdalena; ANUSIEWICZ, Iwona; SKURSKI, Piotr. The mechanism of a retro-diels–alder fragmentation of luteolin: Theoretical studies supported by electrospray ionization tandem mass spectrometry results. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1032, 2022.

SPINDOLA, Kassia CW *et al.* Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae). **Parasites & vectors**, v. 7, p. 1-7, 2014.

STREHMEL, Nadine; STRUNK, David; STREHMEL, Veronika. White birch trunk extracts as a source of organic compounds. **ChemistrySelect**, v. 2, n. 29, p. 9607-9619, 2017.

ŠUKOVIĆ, Danijela *et al.* Phenolic profiles of leaves, grapes and wine of grapevine variety vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 138, 2020.

SUKSAMRARN, Sunit *et al.* Ceanothane-and lupane-type triterpenes with antiplasmodial and antimycobacterial activities from *Ziziphus cambodiana*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 54, n. 4, p. 535-537, 2006.

SUN, Dongxiao *et al.* Simultaneous determination of four flavonoids and one phenolic acid in rat plasma by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after

oral administration of the Herba Desmodii Styracifolii extract. **Journal of Chromatography B**, v. 932, p. 66-73, 2013.

SUN, Xiaoya *et al.* Characterization and identification of chemical constituents in Corni Fructus and effect of storage using UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS. **Food Research International**, v. 164, p. 112330, 2023.

TAAMALLI, Amani *et al.* LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. **Phytochemical analysis**, v. 26, n. 5, p. 320-330, 2015.

TERZIAN, Ana Carolina B. *et al.* Isolation and characterization of Mayaro virus from a human in Acre, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 2, p. 401, 2015.

TEWTRAKUL, Supinya *et al.* HIV-1 protease and HIV-1 integrase inhibitory substances from *Eclipta prostrata*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 21, n. 11, p. 1092-1095, 2007.

THOMAS, Eyana *et al.* Plant-based natural products and extracts: Potential source to develop new antiviral drug candidates. **Molecules**, v. 26, n. 20, p. 6197, 2021.

TREML, Jakub *et al.* Natural products-derived chemicals: Breaking barriers to novel anti-HSV drug development. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 154, 2020.

TSANG, Nga Yi *et al.* Ebola entry inhibitors discovered from *Maesa perlaris*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2620, 2022.

VERNAL, Sebastian; MARTINI, Camila CR; DA FONSECA, Benedito AL. Oropouche virus–associated aseptic meningoencephalitis, Southeastern Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 2, p. 380, 2019.

VISALLI, Robert J. *et al.* Ionic derivatives of betulinic acid exhibit antiviral activity against herpes simplex virus type-2 (HSV-2), but not HIV-1 reverse transcriptase. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 16, p. 3168-3171, 2015.

WANG, Mingxun *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828-837, 2016.

WANG, Ying *et al.* Flavone C-glycosides from the leaves of *Lophatherum gracile* and their *in vitro* antiviral activity. **Planta Medica**, v. 78, n. 01, p. 46-51, 2012.

WU, Juanjuan *et al.* Preliminary Study on Total Component Analysis and *in vitro* Antitumor Activity of *Eucalyptus* Leaf Residues. **Molecules**, v. 29, n. 2, p. 280, 2024.

XU, Hong-Yan *et al.* Anti-hepatitis B virus activity of swertisin isolated from *Iris tectorum* Maxim. **Journal of ethnopharmacology**, v. 257, p. 112787, 2020.

YAO, Dachun *et al.* Betulinic acid-mediated inhibitory effect on hepatitis B virus by suppression of manganese superoxide dismutase expression. **The FEBS journal**, v. 276, n. 9, p. 2599-2614, 2009.

YANG, Bing-Ya *et al.* Protective effect of procyanidin B2 against CCl₄-induced acute liver injury in mice. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12250-12265, 2015.

YANG, Zi-Feng *et al.* Comparison of in vitro antiviral activity of tea polyphenols against influenza A and B viruses and structure–activity relationship analysis. **Fitoterapia**, v. 93, p. 47-53, 2014.

YI, Yang *et al.* Natural triterpenoids from licorice potently inhibit SARS-CoV-2 infection. **Journal of advanced research**, v. 36, p. 201-210, 2022.

XIE, Chenghui *et al.* The açai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- α and IL-6 production through inhibiting NF- κ B activation and MAPK pathway. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1184-1191, 2012.

YU, Hong *et al.* Protective roles of isoastilbin against Alzheimer's disease via Nrf2-mediated antioxidation and anti-apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 1406-1416, 2019.

ZHANG, Jianguang *et al.* Phytochemistry and antioxidant activities of the rhizome and radix of *Millettia speciosa* based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7398, 2022.

ZHANG, Haijiang *et al.* A new flavonoid glycoside from *Vaccaria hispanica*. **Natural product communications**, v. 6, n. 11, p. 1934578X1100601112, 2011.

g

ZHANG, Yufang *et al.* Cotton flower metabolites inhibit SARS-CoV-2 main protease. **FEBS Open bio**, v. 12, n. 10, p. 1886-1895, 2022.

ZHAO, Jing-Han *et al.* Natural products as potential lead compounds to develop new antiviral drugs over the past decade. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 115726, 2023.

ZHAO, Yu *et al.* Design, synthesis, and structure activity relationship analysis of new betulinic acid derivatives as potent HIV inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 215, p. 113287, 2021.

ZHU, Qin-Chang *et al.* Inhibition of enterovirus 71 replication by chrysosplenetin and penduletin. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 44, n. 3, p. 392-398, 2011.