

**Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy Ribeiro
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

ELLEN CAROLINE FEITOZA PIRES

**Triagem *in vitro* de extratos de plantas do Cerrado ricos em polifenóis
frente a *Alphavirus***

**Brasília – DF
2025**

**Universidade de Brasília
Campus Universitário Darcy Ribeiro
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

ELLEN CAROLINE FEITOZA PIRES

**Triagem *in vitro* de extratos de plantas do Cerrado ricos em polifenóis
frente a *Alphavirus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Molecular da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Doutor (a) em Biologia Molecular.

Orientador: Prof.º Dr.º Bergmann Morais Ribeiro.

**Brasília/DF
2025**

*Dedico este trabalho ao meu amado esposo,
Esdras, e aos meus queridos pais, Ademir e
Sebastiana, cujo apoio se reflete em cada
uma de minhas realizações.*

AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus, por me conceder força e perseverança ao longo desta jornada.

Ao meu esposo, Esdras Souza, pelo incentivo incondicional e compreensão ao longo do percurso acadêmico.

Aos meus pais, Ademir Pires e Sebastiana Feitoza, pelo apoio inestimável e por compartilharem comigo cada etapa dessa trajetória, da graduação ao doutorado. Nada disso seria possível sem vocês.

Ao Professor Bergmann Moraes Ribeiro, por aceitar a responsabilidade de me orientar, mesmo sem me conhecer previamente. Sou imensamente grata pela confiança, pelo profissionalismo, pela diligência e pelo vasto conhecimento científico compartilhado ao longo da pesquisa.

À Professora Pérola Magalhães, do Laboratório de Produtos Naturais da FS/UnB, pela generosidade ao disponibilizar os materiais vegetais fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Professor Omar Estrada, do Laboratório de Produtos Naturais da FS/UnB, cuja expertise foi essencial para os resultados obtidos. Agradeço pelo profissionalismo, parceria e paciência ao me introduzir no estudo fitoquímico, uma área até então inédita para mim, mas que despertou ainda mais meu fascínio pela química farmacêutica.

À banca examinadora, por aceitar contribuir cientificamente para esta pesquisa, enriquecendo-a com suas valiosas observações e considerações.

Aos colegas do Laboratório de Baculovírus IB/UnB, com destaque para Raquel Almeida, Hillary Velame, Cezar Marques, Fernanda Coelho e Bruno Milhomem, pela amizade, colaboração científica e apoio constante.

À CAPES, pelo suporte financeiro indispensável à realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pelas oportunidades de aprendizado proporcionadas por meio de simpósios e disciplinas, que ampliaram minha visão sobre biologia molecular e celular, contribuindo significativamente para o aprimoramento deste trabalho.

Por fim, à Universidade de Brasília (UnB), cuja estrutura e recursos possibilitaram a condução e execução desta pesquisa com êxito.

RESUMO

Os vírus chikungunya (*Alphavirus chikungunya*, CHIKV) e mayaro (*Alphavirus mayaro*, MAYV) são arbovírus do gênero *Alphavirus*, reemergentes, que causam distúrbios musculoesqueléticos debilitantes em humanos, caracterizados por febre, poliartralgia e mialgia. Atualmente, não há vacinas ou tratamentos para pessoas infectadas por CHIKV e MAYV, ressaltando a necessidade de aprofundar o conhecimento sobre suas interações com células hospedeiras e seus mecanismos de replicação viral. O bioma Cerrado é considerado um importante centro de biodiversidade abrigando espécies úteis para a medicina popular. Por esse motivo, compostos derivados de plantas que interferem nos ciclos de replicação viral têm sido propostos como estratégias promissoras para o desenvolvimento de antivirais. Nesse estudo preliminar, avaliamos o potencial antiviral *in vitro* de extratos metanólicos das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc, obtidos por dois métodos de extração: maceração (CAH21) e soxhlet (CAH24). A citotoxicidade dos extratos foi determinada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, avaliando a viabilidade lisossomal, enquanto a atividade antiviral foi analisada por ensaio de placa de lise em células Vero, na etapa de pós-tratamento. Os ensaios revelaram atividade anti-CHIKV e anti-MAYV nos extratos de *C. alba*. Em seguida, realizamos a caracterização fitoquímica dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). A partir de análises *in silico*, identificamos os flavonoides naringina e vitexina como potenciais inibidores das proteases virais (nsP2) de ambos os vírus. Além disso, investigamos o potencial antiviral de extratos aquosos ricos em polifenóis das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (ED), *Erythroxylum suberosum* (ES), *Miconia chamissois* Naudin (MC), *Morus nigra* Linné (MN) e *Sapindus saponaria* L. (SS), em diferentes etapas do ciclo de replicação do CHIKV. A citotoxicidade dos extratos, frações e das subfrações, foi avaliada pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro, enquanto a atividade antiviral foi determinada por ensaio de placa de lise em células Vero. Os compostos foram isolados por cromatografia de coluna (CC) de Sílica gel ou Sephadex e identificados por cromatografia de camada delgada (CCD), e ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H e ^{13}C), sendo caracterizadas como cumarinas glicosiladas. Os ensaios *in vitro* demonstram que os extratos ED e ES contêm moléculas com atividade anti-CHIKV. A partir de um fracionamento bio-guiado, investigamos a atividade antiviral das frações, subfrações e compostos presentes no extrato ES. Os resultados desse estudo indicam que metabólitos

secundários dos extratos CAH21, CAH24, ED e ES são potenciais fontes de novos compostos antivirais, podendo ser explorados para o desenvolvimento de fármacos anti-CHIKV e/ou anti-MAYV.

Palavras-chave: fracionamento, ensaio bio-guiado, flavonoides, cumarinas, vírus Chikungunya, vírus Mayaro.

ABSTRACT

Chikungunya (*Alphavirus chikungunya*, CHIKV) and mayaro (*Alphavirus mayaro*, MAYV) viruses are reemerging arboviruses of the *Alphavirus* genus that cause debilitating musculoskeletal disorders in humans characterized by fever, polyarthralgia, and myalgia. To date, there is no available vaccine or specific treatment for CHIKV and MAYV infections, highlighting the need to deepen our understanding of host-virus interactions and viral replication strategies. The Cerrado biome is considered an important center of biodiversity, harboring species useful for folk medicine. Therefore, plant-derived compounds that interfere with viral replication cycles have been proposed as promising antiviral agents. In this preliminary study we evaluated the *in vitro* antiviral potential of methanolic extracts from the roots of *Chiococca alba* (L.) Hitchc, obtained through two extraction methods: maceration (CAH21) and soxhlet (CAH24). The cytotoxicity of *C. alba* extracts was assessed using the neutral red incorporation assay to determine lysosomal viability, while antiviral activity was evaluated by the plaque reduction assay in the post-treatment step, both performed in Vero cells. The *in vitro* assays showed that *C. alba* extracts exhibit anti-CHIKV and anti-MAYV activity. Subsequently, we identified the metabolites present in the extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). An *in silico* analysis was conducted to assess the binding potential of the flavonoids naringin and vitexin to the active sites of the viral proteases (nsP2) of both viruses. Our findings indicate that *C. alba* is a source of antiviral metabolites. Additionally, we evaluated the antiviral potential of aqueous extracts rich in polyphenols from the leaves of *Eugenia dysenterica* DC (ED), *Erythroxylum suberosum* (ES), *Miconia chamissois* Naudin (MC), *Morus nigra* Linné (MN) and *Sapindus saponaria* L. (SS), at different stages of the CHIKV replication cycle. This assessment included *in vitro* analysis and a phytochemical study of the extract exhibiting the highest antiviral activity. The cytotoxicity profiles of extracts, fractions, and subfractions were determined through lysosomal viability using the neutral red incorporation assay, while antiviral activity was assessed by plaque reduction assay in Vero cells. Bioactive compounds were isolated using silica gel or Sephadex column chromatography (CC) and identified through thin layer chromatography (TLC), HPLC-DAD, and nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C NMR), revealing the presence of glycosylated coumarins. *In vitro* assays demonstrated that ED and ES extracts contain molecules with anti-CHIKV

activity. Using a bioassay-guided fractionation approach, we further investigated the antiviral activity of the fractions, subfractions, and isolated compounds from the ES extract. The findings presented here indicate that the secondary metabolites of CAH21, CAH24, ED, and ES extracts represent a promising source of new antiviral compounds and hold potential for the development of novel anti-CHIKV and/or anti-MAYV drugs.

Keywords: extract fractionation, bio-guided assay, flavonoids, coumarins, *Chikungunya virus*, *Mayaro virus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
CAH21	Extrato metanólico de <i>Chiococca alba</i> obtido por maceração
CAH24	Extrato metanólico de <i>Chiococca alba</i> obtido por Soxhlet
CC	Cromatografia em Coluna
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CHIKV	<i>Alphavirus chikungunya</i>
CMC	<i>Carboxymethylcellulose sodium salt</i>
DENV	<i>Orthoflavivirus denguei</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
ED	Extrato aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i>
ES	Extrato aquoso de <i>Erythroxylum suberosum</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC–MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>
HEPES	Sal de sódio do ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano sulfônico
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IC ₅₀	Concentração do composto que inibe 50% do vírus
IS	Índice de seletividade
MAYV	<i>Alphavirus mayaro</i>
MC	Extrato aquoso de <i>Miconia chamissois</i> Naudin
MD	<i>Molecular dynamics</i>
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
MetOH	Metanol
MN	Extrato etanólico de <i>Morus nigra</i> Linné
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
nsP	<i>Non-structural protein</i>
NV	Neutral Red Uptake
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBD	<i>Protein Data Bank</i>

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
QMEAN	<i>Qualitative Model Energy Analysis</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFB	Soro fetal bovino
SI	<i>Selectivity index</i>
SS	Extrato aquoso de <i>Sapindus saponaria</i> L.
UV	Ultravioleta
VN	Vermelho neutro
ZIKV	<i>Orthoflavivirus zikaense</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
1 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 ARBOVÍRUS	18
1.2 FAMÍLIA <i>TOGAVIRIDAE</i> , GÊNERO <i>ALPHAVIRUS</i>	22
1.3 DESENVOLVIMENTOS RECENTES EM VACINAS CONTRA <i>ALPHAVIRUS</i>	26
1.4 VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV).....	27
1.5 VÍRUS MAYARO (MAYV)	30
1.6 PLANTAS MEDICINAIS.....	31
1.7 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	32
1.7.1 <i>Flavonoides</i>	34
1.7.2 <i>Cumarinas</i>	35
1.8 PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO	37
2 CAPÍTULO 1: ANTIVIRAL POTENTIAL OF <i>CHIOCOCCA ALBA</i> (L.) HITCH. PLANT EXTRACTS AGAINST CHIKUNGUNYA AND MAYARO VIRUSES: A PRELIMINARY ANALYSIS	43
2.1 INTRODUCTION	44
2.2 RESULTS	45
2.2.1 <i>Total Chemical Profiles of C. alba CAH21 and CAH24 Extracts</i>	45
2.2.2 <i>Partial Chemical Profiles of C. alba CAH21 and CAH24 Extracts</i>	45
2.2.3 <i>Cytotoxic Assay</i>	46
2.2.4 <i>Antiviral Activity Analysis</i>	47
2.2.5 <i>Modeling and Validation of the MAYV nsP2 Structure</i>	49
2.2.6 <i>Molecular Docking</i>	50
2.3 DISCUSSION	52
2.4 MATERIALS AND METHODS	56
2.4.1 <i>Plant Material</i>	56
2.4.2 <i>Preparation of Extracts</i>	57
2.4.3 <i>Chemical Analysis of Extracts</i>	57
2.4.4 <i>Cells and Viruses</i>	58
2.4.5 <i>Viral Titration by Plaque Assay</i>	58
2.4.6 <i>Cytotoxicity Assay</i>	59
2.4.7 <i>Antiviral Assays</i>	59
2.4.8 <i>In silico Analysis of the Interaction between Molecules of C. alba and the nsP2 Protease of CHIKV and MAYV</i>	60
2.4.9 <i>Statistical Analysis</i>	60
2.5 CONCLUSIONS.....	61
2.6 REFERENCES	61
3 CAPÍTULO 2: TRIAGEM IN VITRO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO RICOS EM POLIFENÓIS FRENTE AO VÍRUS CHIKUNGUNYA	68
3.1 INTRODUÇÃO	68
3.2 OBJETIVO	70
3.2.1 <i>Objetivos específicos</i>	70
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	71
3.3.1 <i>Extratos vegetais</i>	71
3.3.2 <i>Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</i>	71
3.3.3 <i>Cromatografia em coluna (CC)</i>	72

3.3.4	<i>Análise espectroscópica</i>	72
3.3.5	<i>Cultura de células</i>	72
3.3.6	<i>Vírus: Estoque e multiplicação viral</i>	73
3.3.7	<i>Titulação viral por Ensaio de Placa de Lise</i>	73
3.3.8	<i>Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro</i>	74
3.3.9	<i>Efeito dos extratos vegetais na replicação do vírus Chikungunya</i>	75
3.3.10	<i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	77
3.3.11	<i>Ensaio de fluorescência</i>	78
3.3.12	<i>Análise estatística</i>	79
3.4	RESULTADOS	80
3.4.1	<i>Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos</i>	80
3.4.2	<i>Análise da atividade antiviral dos extratos brutos</i>	81
3.4.3	<i>Partição sólido-líquido dos extratos ED e ES</i>	86
3.4.4	<i>Caracterização farmacognóstica por CCD, avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-CHIKV das frações dos extratos ED e ES</i>	86
3.4.5	<i>Caracterização farmacognóstica por CCD, avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-CHIKV da fração do extrato ES (ESE2)</i>	90
3.4.6	<i>Isolamento, avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-CHIKV das moléculas presentes na subfração ESE2F1</i>	95
3.4.7	<i>Microscopia confocal de células Vero estimuladas com ESE2F1-A e ESE2F1-D</i>	98
3.4.8	<i>Microscopia eletrônica de transmissão de células C6/36 infectadas com CHIKV</i>	99
3.5	DISCUSSÃO	100
3.6	CONCLUSÃO	106
3.7	REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01:

TABLE 1. CHEMICAL PROFILE OF <i>C. ALBA</i> EXTRACTS IDENTIFIED BY HPLC.....	45
TABLE 2. CYTOTOXICITY, SELECTIVITY INDEX, AND REDUCTION PERCENTAGE IN THE PLAQUE NUMBERS FOR <i>C. ALBA</i> EXTRACTS AGAINST CHIKV AND MAYV IN VERO CELLS AFTER 48 H.	49
TABLE 3. MOLECULAR DOCKING RESULTS FOR THE COMPLEXES FORMED BETWEEN THE <i>C. ALBA</i> EXTRACT MOLECULES AND THE NSP2 PROTEINS OF CHIKV AND MAYV.....	50

REFERENCIAL TEÓRICO E CAPÍTULO 02:

TABELA 1. LISTA DE FAMÍLIAS DE ARBOVÍRUS TRANSMITIDOS PARA HUMANOS VIA ARTRÓPODES.....	20
TABELA 2. PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DE SEIS PLANTAS DO CERRADO RICAS EM POLIFENÓIS.	39
TABELA 3. PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS PARA OS EXTRATOS ED E ES FRENTE A CHIKV EM CÉLULAS VERO APÓS 48 H.	83
TABELA 4. ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DA ATIVIDADE ANTI-CHIKV DOS EXTRATOS <i>E. DYSENTERICA</i> (ED) E <i>E. SUBEROSUM</i> (ES).....	84
TABELA 5. CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS EXPERIMENTAIS DA SEPARAÇÃO DO ESE2 EM COLUNA DE SEPHADEX LH-20.....	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 01:

- FIGURE 1.** CYTOTOXICITY ASSAY. (A) CELL VIABILITY AFTER TREATMENT USING VERO CELLS, INCUBATED FOR 48 H WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF *C. ALBA* EXTRACTS CAH21 AND CAH24. (B) CC_{50} AND (C) CC_{90} VALUES. ORDINARY ONE-WAY ANOVA MULTIPLE COMPARISONS WERE USED TO DETERMINE STATISTICAL SIGNIFICANCE FROM CELL CONTROL (* $p = 0.1$; *** $p < 0.001$).....47
- FIGURE 2.** ANTIVIRAL ACTIVITY OF *C. ALBA* EXTRACTS AGAINST CHIKV AND MAYV. (A) SCHEMATIC DESCRIPTION OF THE ANTIVIRAL ASSAY. (B) DOSE-RESPONSE ANTIVIRAL ACTIVITY OF *C. ALBA* EXTRACTS ON THE REPLICATION OF CHIKV IN A PLAQUE REDUCTION ASSAY. THE DATA ARE THE MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF THREE INDEPENDENT EXPERIMENTS. (C) THE SCATTER DOT PLOT SHOWS THE INDIVIDUAL AND MEAN VALUES OF CHIKV TITER ($\log_{10}$ PFU/mL) AT 40, 60, 80, AND 100 MG/mL OF *C. ALBA* EXTRACTS. (D) DOSE-RESPONSE ANTIVIRAL ACTIVITY OF *C. ALBA* EXTRACTS ON THE REPLICATION OF MAYV IN A PLAQUE REDUCTION ASSAY. THE DATA ARE THE MEANS AND STANDARD DEVIATIONS OF THREE INDEPENDENT EXPERIMENTS. (E) THE SCATTER DOT PLOT SHOWS THE INDIVIDUAL AND MEAN VALUES OF THE MAYV TITER ($\log_{10}$ PFU/mL) AT 40, 60, 80, AND 100 MG/mL OF *C. ALBA* EXTRACTS. INHIBITORY CONCENTRATION 50% (IC_{50}) VALUES WERE CALCULATED BY NONLINEAR REGRESSION ANALYSIS USING GRAPHPAD PRISM SOFTWARE (VERSION 8.01) BY PLOTTING LOG INHIBITOR VERSUS NORMALIZED RESPONSE (VARIABLE SLOPE). AN ORDINARY ONE-WAY ANOVA WITH MULTIPLE COMPARISONS WAS USED TO DETERMINE STATISTICAL SIGNIFICANCE FROM VIRAL CONTROL (**** $p < 0.0001$).....48
- FIGURE 3.** MAYV NSP2 STRUCTURE MODELING AND VALIDATION. (A) RAMACHANDRAN'S GRAPH FOR MAYV NSP2. THE BLACK ARROW INDICATES THE PRESENCE OF THE PROTEIN IN THE MOST FAVORABLE REGION. DOTS SHOW WHERE THE DIHEDRAL ANGLES OF AMINO ACIDS IN A PROTEIN STRUCTURE FALL. BLUE DOTS REPRESENT RESIDUES THAT ADOPT ALLOWED OR STABLE CONFORMATIONS ACCORDING TO THE STANDARD GEOMETRY OF PROTEINS, WHILE RED DOTS HIGHLIGHT RESIDUES WITH UNUSUAL OR LESS FAVORABLE DIHEDRAL ANGLES. (B) THE QMEAN (QUALITATIVE MODEL ENERGY ANALYSIS) VALUE, WHICH DESCRIBES THE QUALITY OF THE MODEL. THE RED STAR INDICATES THAT THE POSITION IN Z-SCORES PRESENTS A HIGHLY RELIABLE STRUCTURE AND IS WITHIN THE RANGE OF SCORES TYPICALLY FOUND FOR PROTEINS OF SIMILAR SIZE.....50
- FIGURE 4.** MOLECULAR DOCKING. (A) COMPLEX BETWEEN THE NSP2 PROTEASES OF CHIKV AND (B) MAYV WITH MOLECULES OF LIGAND NARINGIN (GREEN) AND VITEXIN (RED), CLOSE TO THE REGION OF THE ACTIVE SITE (YELLOW), AND A 2D INTERACTION MAP WITH THE AMINO ACIDS.52

REFERENCIAL TEÓRICO E CAPÍTULO 02:

- FIGURA 1.** MECANISMOS DE EMERGÊNCIA PARA ARBOVÍRUS. NO EXEMPLO DOS VÍRUS CITADOS, OS VETORES SÃO TODOS OS MOSQUITOS DO GÊNERO *Aedes*, EXCETO QUE A TRANSMISSÃO URBANA DO VÍRUS OROPOUCHE (*ORTHOBUNYAVIRUS OROPOUCHEENSE*, OROV) ENVOLVE MOSQUITOS DO GÊNERO *CULICOIDES*. VÍRUS COM HISTÓRICO DE EMERGÊNCIA URBANA USAM PRINCIPALMENTE PRIMATAS NÃO HUMANOS COMO HOSPEDEIROS ENZOÓTICOS E INFECTAM PESSOAS POR MEIO DE TRANSBORDAMENTO DIRETO. ABREVIACÕES: CHIKV, VÍRUS CHIKUNGUNYA; DENV, VÍRUS DA DENGUE; JEV, VÍRUS DA ENCEFALITE JAPONESA; MAYV, VÍRUS MAYARO; RVFV, VÍRUS DA FEBRE DO VALE DO RIFT; YFV, VÍRUS DA FEBRE AMARELA; ZIKV, VÍRUS ZIKA. FONTE: WEAVER ET AL. (2018).....19
- FIGURA 2.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA PARTÍCULA VIRAL DA FAMÍLIA *TOGAVIRIDAE*. FONTE: ADAPTADO DE VIRALZONE (2017) – [HTTPS://VIRALZONE.EXPASY.ORG](https://viralzone.expasy.org)22
- FIGURA 3.** DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO GENOMA DO *ALPHAVIRUS*. O GENOMA DE RNA DE SENTIDO POSITIVO TEM CERCA DE 11,5 KB DE COMPRIMENTO E CONTÉM DUAS ORF'S: A ORF-1 QUE CODIFICA AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS (NSP1-4); E ORF-2 PARA PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (C, CAPSÍDEO; E1/2/3, GLICOPROTEÍNAS DO ENVELOPE E 6 K, UMA PROTEÍNA DE 6 kDa). UTR, REGIÃO NÃO TRADUZIDA; 26S, PROMOTOR SUBGENÔMICO; A(N), POLI(A). FONTE: RANGEL & STAPLEFORD (2021).24
- FIGURA 4.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REPLICAÇÃO DE UM *ALPHAVIRUS*. LIGAÇÃO AO RECEPTOR DE MEMBRANA, ENDOCITOSE (ACIDIFICAÇÃO DA VESÍCULA), FUSÃO DE MEMBRANA, PROCESSAMENTO DA ORF-1 (REPLICAÇÃO, TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO), PROCESSAMENTO DA ORF-2 (MATURAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS, TRANSPORTE DE GLICOPROTEÍNAS PROCESSADAS E ATIVAÇÃO POR FURINA), EMPACOTAMENTO DO GENOMA VIRAL, MONTAGEM DO NUCLEOCAPSÍDEO, E BROTAMENTO DOS VÍRIONS. FONTE: RANGEL & STAPLEFORD (2021).26
- FIGURA 5.** VACINAS ANTI-CHIKUNGUNYA. A VACINA LICENCIADA CONTRA CHIKUNGUNYA (IXCHIQ – VLA 1553) E NOVAS VACINAS NO PIPELINE DE DESENVOLVIMENTO CLÍNICO SÃO ILUSTRADAS POR

PLATAFORMA DE ANTÍGENO, FASES DE ENSAIOS CLÍNICOS E LICENCIAMENTO. BBIL - BHARAT BIOTECH INTERNATIONAL LIMITED. FONTE: MAURE ET AL. (2024).	27
FIGURA 6. A) ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS FLAVONOIDES AGLICONAS. B) FLAVONAS, C) FLAVONOIS, D) FLAVANONAS, E) FLAVANOIS, F) ANTOCIANINAS E G) ISOFLAVONAS. FONTE: ALSEEKH ET AL (2020).	35
FIGURA 7. CLASSIFICAÇÃO GERAL DAS PRINCIPAIS CATEGORIAS DE CUMARINAS DERIVADAS DE PLANTAS (ALGUNS EXEMPLOS ESTÃO DESCRITOS EM VERDE). FONTE: OLIVEIRA-ALVES ET AL. (2024).	37
FIGURA 8. FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE TRATAMENTO PARA O ENSAIO ANTIVIRAL DOS EXTRATOS FRENTE A CHIKV. CRIADO COM BIORENDER.COM.....	77
FIGURA 9. ENSAIO DE VIABILIDADE LISOSSOMAL EM CÉLULAS VERO INCUBADAS POR 48 H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS, DE 0,02 A 2,5 MG/ML, SENDO A) ED, B) ES, C) MC, D) MN E E) SS. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM TRIPPLICATA COM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES E ANALISADOS POR REGRESSÃO NÃO LINEAR E POR ONE-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (8.0.1). $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES.....	80
FIGURA 10. ATIVIDADE ANTI-CHIKV DOS EXTRATOS ED E ES, NA ETAPA DE PÓS-TRATAMENTO, A) POR REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE EM PORCENTAGEM E, B) POR REDUÇÃO DA MÉDIA DO TÍTULO VIRAL, PARA CADA CONCENTRAÇÃO TESTADA, EM PFU/ML. OS RESULTADOS SÃO AS MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. NOS ITENS C) E D) CONSTAM OS ENSAIOS DE FORMAÇÃO DE PLACA DE LISE PARA OS EXTRATOS ED E ES, RESPECTIVAMENTE. A MÉDIA DO TÍTULO DO CONTROLE VIRAL DE CHIKV É $3,8 \times 10^5$ PFU/ML. OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA 50% (IC_{50}) FORAM CALCULADOS USANDO ANÁLISE DE REGRESSÃO NÃO LINEAR NO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (VERSÃO 8.01), PLOTANDO O LOG DO INIBIDOR VERSUS A RESPOSTA NORMALIZADA (INCLINAÇÃO VARIÁVEL). $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS, *** $p = 0.0004$; **** $p < 0.0001$	82
FIGURA 11. FLUXOGRAMA ESQUEMÁTICO DO FRACIONAMENTO E ISOLAMENTO DA MOLÉCULA COM ATIVIDADE ANTI-CHIKUNGUNYA. I) INICIALMENTE, 5G DE CADA EXTRATO BRUTO AQUOSO DE <i>EUGENIA DYSENTERICA</i> (ED) E <i>ERYTHROXYLUM SUBEROSUM</i> (ES) FORAM SUBMETIDOS A PARTIÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM 200 ML DE METANOL. II) APÓS A OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS (RESSUSPENDIDAS EM DMSO) E INSOLÚVEIS (RESSUSPENDIDAS EM ÁGUA), REALIZOU-SE A CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC), EM CAMADA DELGADA (CCD) E OS TESTES BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> (CITOTOXICIDADE E ANTIVIRAL). III) DE ACORDO COM OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS E OS RESULTADOS DOS ANTIVIRAIS, AVANÇOU-SE PARA O FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ESE2 POR CC SEGUIDA DE CCD, ALÉM DA REALIZAÇÃO DE NOVOS TESTES BIOLÓGICOS. NESSA ETAPA OBTIVEMOS CINCO SUBFRAÇÕES. IV) APÓS OBTENÇÃO DAS CINCO SUBFRAÇÕES E NOVOS TESTES <i>IN VITRO</i> , OBSERVOU-SE QUE A SUBFRAÇÃO ESE2F1 FOI PROMISSORA NOS TESTES <i>IN VITRO</i> , ALÉM DE SER UMA MOLÉCULA COM MAIOR GRAU DE PUREZA QUANDO COMPARADA COM AS DEMAIS. PORTANTO, AVANÇOU-SE PARA ETAPA DE ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL PARA IDENTIFICAR QUAL OU QUAIS SÃO AS MOLÉCULAS PRESENTES.	85
FIGURA 12. PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) PARA AS FRAÇÕES DE A) E B) EDE2 E EDE3, C) E D) ESE2 E ESE3. FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA: ÁCIDO FÓRMICO: ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL: ÁGUA DESTILADA, 100:11:11:26 (v/v/v/v); REVELADOR: ÁCIDO CÉRICO. OS PERFIS DAS FIGURAS B) E D) FORAM OBTIDOS APÓS BORRIFAR O REVELADOR E VISUALIZAR EM CÂMARA UV A 365 NM.....	87
FIGURA 13. ENSAIO DE VIABILIDADE LISOSSOMAL EM CÉLULAS VERO INCUBADAS POR 48 H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS FRAÇÕES, DE 1,56 A 50 μ G/ML. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM TRIPPLICATA COM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES E ANALISADOS POR REGRESSÃO NÃO LINEAR E POR ONE-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (8.0.1). $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES.....	88
FIGURA 14. ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES ESE2, ESE3, EDE2 E EDE3 CONTRA CHIKV. ETAPA DE CO-TRATAMENTO: A) REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE EM PORCENTAGEM E, C) REDUÇÃO DA MÉDIA DO TÍTULO VIRAL, PARA CADA CONCENTRAÇÃO TESTADA, EM PFU/ML. ETAPA DE PÓS-TRATAMENTO: B) REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE EM PORCENTAGEM E, D) REDUÇÃO DA MÉDIA DO TÍTULO VIRAL, PARA CADA CONCENTRAÇÃO TESTADA, EM PFU/ML. OS RESULTADOS SÃO AS MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. A MÉDIA DO TÍTULO DO CONTROLE VIRAL DE CHIKV NA ETAPA DE CO-TRATAMENTO E DE PÓS-TRATAMENTO FOI DE $1,67 \times 10^6$ E $1,90 \times 10^6$ PFU/ML, RESPECTIVAMENTE. OS RESULTADOS FORAM AVALIADOS ESTATISTICAMENTE ATRAVÉS DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (VERSÃO 8.01), SENDO A) E B) ATRAVÉS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO LINEAR E POR TWO-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES, C) E D) POR ONE-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES. $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES.....	89

- FIGURA 15.** PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) PARA AS SUBFRAÇÕES DE ESE2. **A)** I: ESE2F1, II: ESE2F2, III: ESE2F3, IV: ESE2F4 e V: ESE2F5. FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA: ÁCIDO FÓRMICO: ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL: ÁGUA DESTILADA, 100:11:11:26 (v/v/v/v); REVELADOR: ÁCIDO CÉRICO. O PERFIL DA FIGURA **B)** FOI OBTIDA APÓS BORRIFAR O REVELADOR E VISUALIZAR EM CÂMARA UV A 365 NM.91
- FIGURA 16.** ENSAIO DE VIABILIDADE LISOSSOMAL EM CÉLULAS VERO INCUBADAS POR 48 H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (0,03 A 2 µg/mL) DAS CINCO SUBFRAÇÕES DE ESE2. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA COM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES E ANALISADOS POR REGRESSÃO NÃO LINEAR E POR ONE-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (8.0.1). $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES.92
- FIGURA 17.** ATIVIDADE ANTI-CHIKV DAS SUBFRAÇÕES DE ESE2 NA ETAPA DE CO-TRATAMENTO, **A)** POR REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE EM PORCENTAGEM E, **B)** POR REDUÇÃO DA MÉDIA DO TÍTULO VIRAL, PARA CADA CONCENTRAÇÃO TESTADA, EM PFU/ML. OS RESULTADOS SÃO AS MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. A MÉDIA DO TÍTULO DO CONTROLE VIRAL DE CHIKV FOI DE $1,70 \times 10^6$ PFU/ML. OS RESULTADOS FORAM AVALIADOS ESTATISTICAMENTE ATRAVÉS DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (VERSÃO 8.01) POR REGRESSÃO NÃO LINEAR E POR TWO-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES. $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES. **** $p < 0.0001$; * $p = 0.0255$93
- FIGURA 18.** PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) PARA AS SUBFRAÇÕES DE ESE2. SENDO, I: ESE2F1+ESE2F2, III: APENAS ESE2F3, E V: ESE2F4+ESE2F5. **A)** FASE MÓVEL: ACETATO DE ETILA: ÁCIDO FÓRMICO: ÁCIDO ACÉTICO GLACIAL: ÁGUA DESTILADA, 100:11:11:26 (v/v/v/v); REVELADOR: ÁCIDO CÉRICO. O PERFIL DA FIGURA **B)** FOI OBTIDA APÓS BORRIFAR O REVELADOR E VISUALIZAR EM CÂMARA UV A 365 NM.95
- FIGURA 19.** PERFIL CROMATOGRÁFICO DA SUBFRAÇÃO ESE2F1, OBTIDO POR BÜCHI SEPACORE SYSTEM EQUIPADO COM DOIS MÓDULOS DE BOMBA BÜCHI C-605, UMA UNIDADE DE CONTROLE BÜCHI C-620, UM COLETOR DE FRAÇÕES BÜCHI C-660, E UM FOTÔMETRO UV BÜCHI C-640. ABSORBÂNCIA VERDE: 281 NM; VERMELHO: 210 NM; AMARELO: 323 NM; AZUL: 254 NM.96
- FIGURA 20.** ENSAIO DE VIABILIDADE LISOSSOMAL EM CÉLULAS VERO INCUBADAS POR 48 H COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DAS DUAS MOLÉCULAS DA SUBFRAÇÃO DE ESE2F1: ESE2F1-A E ESE2F1-B. OS EXPERIMENTOS FORAM REALIZADOS EM TRIPLICATA COM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES E ANALISADOS POR REGRESSÃO NÃO LINEAR E POR ONE-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (8.0.1). $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES; * $p = 0,0360$97
- FIGURA 21.** ATIVIDADE ANTI-CHIKV DAS MOLÉCULAS ESE2F1-A E ESE2F1-D, NA ETAPA DE CO-TRATAMENTO, **A)** POR REDUÇÃO DO NÚMERO DE PLACAS DE LISE EM PORCENTAGEM E, **B)** POR REDUÇÃO DA MÉDIA DO TÍTULO VIRAL, PARA CADA CONCENTRAÇÃO TESTADA, EM PFU/ML. OS RESULTADOS SÃO AS MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. A MÉDIA DO TÍTULO DO CONTROLE VIRAL DE CHIKV FOI DE $3,71 \times 10^5$ PFU/ML. OS RESULTADOS FORAM AVALIADOS ESTATISTICAMENTE ATRAVÉS DO SOFTWARE GRAPHPAD PRISM (VERSÃO 8.01) POR REGRESSÃO NÃO LINEAR E POR TWO-WAY ANOVA COM MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES. $p < 0,05$ FORAM CONSIDERADOS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVOS PARA TODAS AS ANÁLISES. **** $p < 0.0001$; NS = NÃO SIGNIFICATIVO.97
- FIGURA 22.** MICROSCOPIA CONFOCAL DE CÉLULAS VERO ESTIMULADAS OU NÃO, POR 48 H, COM AS MOLÉCULAS ESE2F1-A E ESE2F1-D. **A-C)** CÉLULAS VERO SEM ESTÍMULO; **E-G)** CÉLULAS VERO COM 1000 µg/mL DE ESE2F1-A; **I-K)** CÉLULAS VERO COM 1000 µg/mL DE ESE2F1-D; E **D, H E L)** SÃO SOBREPOSIÇÕES DO CONTROLE, ESE2F1-A E ESE2F1-D, RESPECTIVAMENTE. AS SETAS BRANCAS MOSTRAM AS MOLÉCULAS DISPERSAS NO CITOPLASMA (VERDE), MOSTRANDO QUE NÃO COLOCALIZAM COM O NÚCLEO (AZUL). AS BARRAS DE ESCALA DE ESE2F1-A COMPREENDEM EM 25 µM, E AS DEMAIS 10 µM.99
- FIGURA 23.** MICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE CÉLULAS C6/36 NÃO INFECTADAS (**A, B**) E INFECTADAS COM CHIKV MOI=0,1 INCUBADO POR 48H (**C-E**). **A) E B)** CÉLULAS NÃO INFECTADAS MOSTRANDO AS MITOCÔNDRIAS (SETAS AMARELAS), VESÍCULAS AUTOFÁGICAS (SETAS VERMELHAS), POSSÍVEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (SETA VERDE) E O NÚCLEO (N). **C) E D)** CÉLULAS INFECTADAS APRESENTANDO CITOPLASMA E NÚCLEO POUCO ELETRODENSOS, ALÉM DE ALTA PRODUÇÃO DE MITOCÔNDRIAS (SETAS AMARELAS) E ESTRUTURAS SEMELHANTES A ENDOSSOMOS (SETAS BRANCAS). AS MEMBRANAS DO NÚCLEO (N) E DO NÚCLEOLO (N) AINDA ESTÃO BEM PRESERVADAS. **E)** CÉLULAS INFECTADAS MOSTRANDO VÍRIONS (SETAS ALARANJADAS) BROTANDO DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (SETAS VERDES) ENQUANTO AS MITOCÔNDRIAS APRESENTAM UMA MORFOLOGIA ALONGADA ANORMAL SUGESTIVA (SETA AMARELA). AS BARRAS DO CONTROLE CELULAR

REPRESENTAM 2 MM, 0.2 MM E 2 MM, RESPECTIVAMENTE, E AS BARRAS DE 48 H APÓS INFECÇÃO
REPRESENTAM 2 MM, 1 MM, 2 MM E 100 MM, RESPECTIVAMENTE.....100

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Arbovírus

O termo arbovírus origina-se da expressão da língua inglesa *arthropod-borne viruses* – vírus transmitidos por artrópodes, no qual carrapatos e mosquitos são os principais vetores (Cleton et al. 2012). Muitos desses vírus têm a capacidade de causar grandes epidemias, pois a propagação viral ocorre nos tecidos dos artrópodes vetores, permitindo a transmissão do vírus aos vertebrados por meio da picada e ampliando rapidamente sua disseminação (Franz et al. 2015; Weaver, 2018).

A maioria dos arbovírus apresentam um ciclo zoonótico, no qual a propagação viral ocorre tanto entre animais quanto entre humanos (Wilder-Smith et al. 2017; Guth et al. 2020). Portanto, são mantidos em um ciclo de transmissão envolvendo artrópodes (vetores) e vertebrados como principais hospedeiros amplificadores, garantindo a manutenção do vírus na natureza (Fernández-Salas et al. 2016). Por esse motivo, há preocupações em relação à doação de sangue, transplante de órgãos e quaisquer procedimentos que envolvam transfusão de sangue em áreas endêmicas (Long & Heise, 2012; Petersen & Epstein et al. 2014).

De acordo com Weaver (2018), os ciclos e mecanismos de transmissão de arbovírus para humanos podem ser agrupados em três categorias: Via animais silvestres, nos quais o vetor adquire o vírus de um animal silvestre e o transmite a um hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Exemplos incluem o vírus do oeste do Nilo (*Orthoflavivirus nilense*, WNV); via animais domesticados, através da amplificação viral nos animais, servindo como reservatórios para infecção humana por meio dos vetores. Exemplos incluem o vírus da febre do vale do Rift (*Phlebovirus riftense*, RVFV), o vírus da encefalite japonesa (*Orthoflavivirus japonicum*, JEV); e o vírus da encefalite equina venezuelana (*Alphavirus venezuelan*, VEEV), cujos principais hospedeiros reservatórios são bovinos, suínos e equinos, respectivamente e por último; via homem-artrópode-homem, no qual a pessoa infectada pode transferir o vírus ao artrópode não infectado, através da picada, tornando-o capaz de transmitir o vírus para outros humanos. Além disso, o vírus pode ser transmitido entre humanos pelo contato sexual. Entre as categorias, esta última é a mais preocupante, devido ao alto potencial de infecção, espalhando-se rapidamente em grandes áreas e podendo evoluir para epidemias. Os principais vírus que participam desta categoria incluem: vírus chikungunya (*Alphavirus chikungunya*, CHIKV), vírus da dengue (*Orthoflavivirus denguei*, DENV), vírus mayaro (*Alphavirus*

mayaro, MAYV), vírus da febre amarela (*Orthoflavivirus flavi*, YFV) e o vírus da Zika (*Orthoflavivirus zikaense*, ZIKV). No ciclo urbano epidêmico, os humanos são os principais hospedeiros amplificadores (Auguste et al. 2015; Iranpour et al., 2016; Huang et al., 2019) (Figura 1).

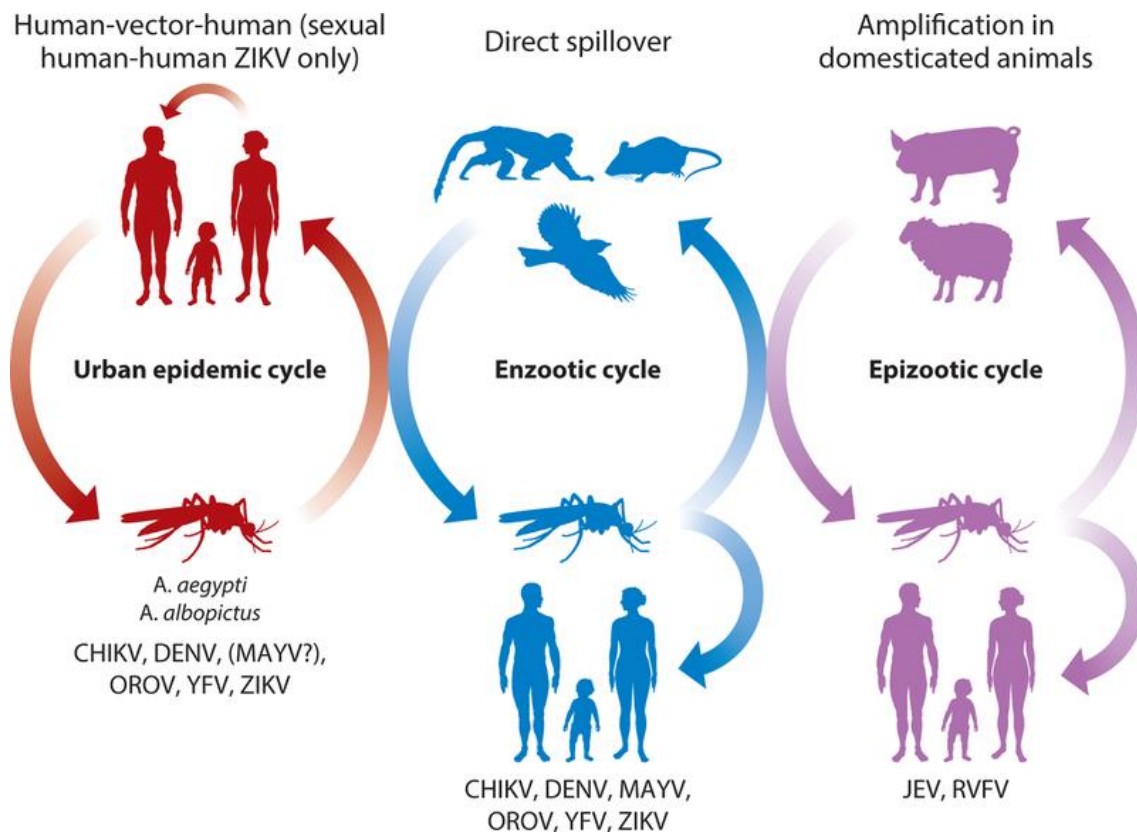


Figura 1. Mecanismos de emergência para arbovírus. No exemplo dos vírus citados, os vetores são todos os mosquitos do gênero *Aedes*, exceto que a transmissão urbana do vírus Oropouche (*Orthobunyavirus oropoucheense*, OROV) envolve mosquitos do gênero *Culicoides*. Vírus com histórico de emergência urbana usam principalmente primatas não humanos como hospedeiros enzoóticos e infectam pessoas por meio de transbordamento direto. Abreviações: CHIKV, vírus chikungunya; DENV, vírus da dengue; JEV, vírus da encefalite japonesa; MAYV, vírus Mayaro; RVFV, vírus da febre do Vale do Rift; YFV, vírus da febre amarela; ZIKV, vírus Zika. Fonte: Weaver et al. (2018).

A disseminação global de zoonoses representa uma ameaça à saúde humana. Novos ciclos enzoóticos surgem quando zoonoses são introduzidas em novas regiões, infectam a fauna local e se mantêm em populações de animais hospedeiros. Atualmente, as condições globais são mais propícias do que nunca para a formação de novos ciclos enzoóticos. A reincidência desses arbovírus deve-se principalmente a fatores ambientais, como desmatamento e mudanças climáticas; à evolução e adaptação viral através de alterações genéticas; à característica antropofílica do vetor e sua expansão geográfica e;

à superpopulação humana (Huang et al. 2019; Guth et al. 2020; Rangel & Stapleford, 2021).

Considerando as características genômicas e morfológicas dos arbovírus que causam doenças em humanos, estes podem ser classificados em sete famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Spinareoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae* e *Orthomyxoviridae* (Viglietta et al. 2021). De aproximadamente 500 espécies, verificou-se que mais de 150 são patogênicas aos seres humanos, entre as quais a maior parte são transmitidas a humanos através de insetos hematófagos (Cleton et al., 2012; Blitvich, 2016). Dentre essas famílias, os arbovírus da família *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Orthomyxoviridae* são preocupantes em questões de saúde pública (Gubler, 2002) (Tabela 1). Vírus que possuem genomas de RNA são mais propícios a mutações, portanto este grande número de arbovírus, apresentam ampla plasticidade genética, favorecendo o aumento da reprodução entre os hospedeiros e artrópodes (Hanley & Weaver, 2008).

Tabela 1. Lista de famílias de arbovírus transmitidos para humanos via artrópodes.

Família	Gênero	Genoma	Exemplos
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	ss RNA+	<i>Alphavirus chikungunya</i> (CHIKV); <i>Alphavirus mayaro virus</i> (MAYV); <i>Alphavirus sindbis</i> (SINV); <i>Alphavirus eastern</i> (EEEV); <i>Alphavirus onyong</i> (ONNV)
<i>Flaviviridae</i>	<i>Orthoflavivirus</i>	ss RNA+	<i>Orthoflavivirus denguei</i> , (DENV); <i>Orthoflavivirus flavi</i> (YFV); <i>Orthoflavivirus zikaense</i> (ZIKV); <i>Orthoflavivirus nilense</i> (WNV)
<i>Spinareoviridae</i>	<i>Coltivirus</i>	ds RNA	<i>Coltivirus dermacentoris</i>
<i>Nairoviridae</i>	<i>Orthonairovirus</i>	ss RNA–	<i>Orthonairovirus haemorrhagiae</i>

<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	ss RNA–	<i>Orthobunyavirus</i>
			<i>bunyamweraense</i> ;
			<i>Orthobunyavirus encephalitidis</i> ;
			<i>Orthobunyavirus lacrosseense</i> ;
			<i>Orthobunyavirus oropoucheense</i> (OROV)
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Phlebovirus</i>	ss RNA–	<i>Phlebovirus riftense</i> (RVFV)
	<i>Uukuvirus</i>	ss RNA–	<i>Lihan uukuvirus</i>
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Qaranjavirus</i>	ss RNA–	<i>Quaranjavirus quaranfilense</i>
	<i>Thogotovirus</i>	ss RNA–	<i>Thogotovirus thogotoense</i> ;
			<i>Thogotovirus dhorienne</i>

ss RNA–, RNA de fita simples de sentido negativo; ss RNA+, RNA de fita simples de sentido positivo; ds RNA, RNA de fita dupla.

Fonte: Adaptado de Viglietta et al. (2021); Viralzone (2024) - <https://viralzone.expasy.org>; International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV, 2025); Para informações atualizadas, acesse: <https://ictv.global/taxonomy>.

1.2 Família *Togaviridae*, Gênero *Alphavirus*

Até 1984, os vírus da família *Flaviviridae* estavam inseridos na família *Togaviridae*, devido às características em comuns entre elas como a similaridade na estrutura e no tamanho, e por conterem um genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, que são caracterizadas por um único mRNA resultando em uma poliproteína que é modificada na etapa pós-traducional (Westaway et al. 1985; Calisher & Monath, 1988).

Entretanto, através do avanço da biologia molecular e da microscopia eletrônica, observou-se diferenças estruturais e nas glicoproteínas das duas famílias. Os vírus da família *Flaviviridae* contêm os genes das proteínas estruturais na extremidade 5' enquanto na família *Togaviridae*, os genes dos vírus são encontrados na extremidade 3'. Além disso, ao contrário do que ocorre na família *Togaviridae*, o terminal 3' do genoma viral da família *Flaviviridae* não é poliadenilado, formando uma estrutura de *loop* (Schlesinger & Schlesinger, 2013; Chase, 2020).

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2025), a família *Togaviridae* possui apenas um gênero, o *Alphavirus*, abrangendo vírus com 65 a 70 nm de diâmetro, envelopados, esféricos, icosaedros, e com genoma de RNA de senso positivo. O capsídeo contém 60 unidades assimétricas compostas por 4 proteínas (T=4), totalizando 240 proteínas do capsídeo. O envelope contém 80 trímeros, cada trímero contém três heterodímeros de E1/E2 (Figura 2) (ViralZone, 2017).

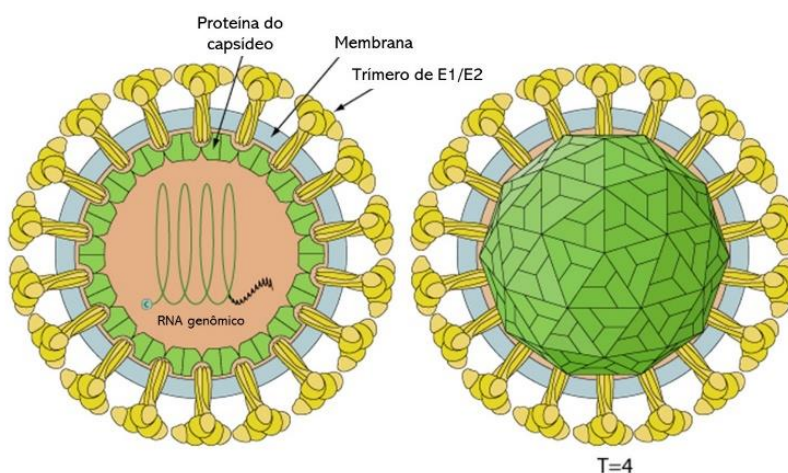


Figura 2. Representação esquemática de uma partícula viral da família *Togaviridae*.
Fonte: Adaptado de ViralZone (2017) – <https://viralzone.expasy.org>

O gênero *Alphavirus* abrange 32 espécies de diferentes variantes e linhagens virais, sendo agrupadas em 7 complexos antigênicos (Kuhn, 2013). O gênero foi dividido

em dois grandes grupos de acordo com as características clínico-patológicas e localização geográfica: Velho Mundo e Novo Mundo. Além disso, os dois grupos são distintos quanto a patogênese durante a infecção humana, os vírus do Velho Mundo são artritogênicos e causam doenças febris, já os vírus do Novo Mundo causam encefalite (Ryman & Klimstra, 2008).

Alguns dos *Alphavirus* do Velho Mundo são: CHIKV encontrado na África, Ásia e América do Sul; *Alphavirus onyong* (ONNV) presente na África; MAYV nas Américas e; *Alphavirus rossriver* (RRV) e *Alphavirus barmah* (BFV) ambos encontrados na Austrália (Levi & Vignuzzi, 2019). Já os do Novo Mundo são conhecidos por um sintoma severo em comum, a encefalite, são eles: *Alphavirus western* (WEEV) e *Alphavirus eastern* (EEEV), ambos na América do Norte; e, VEEV, existente na América Central e do Sul (Zacks & Paessler 2010).

A etapa de replicação destes *Alphavirus* inicia-se a partir da ligação das glicoproteínas de superfície viral com os receptores celulares específicos. Esses receptores variam entre as espécies de *Alphavirus*. O receptor para *Alphavirus sindbis* (SINV) é o NRAMP2 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 2*) (Rose et al. 2011), porém, os detalhes de como o CHIKV entra nas células hospedeiras, ainda não foram completamente elucidados. Existem algumas proteínas celulares que interagem com os *Alphavirus*, que pode explicar o aumento ou diminuição da infectividade (Schnierle, 2019). Entretanto, é sabido que a internalização desses vírus nas células hospedeiras ocorrem por endocitose, mediados pela proteína clatrina, e após desnudamento do material genético, ocorre a expressão gênica viral (Strauss & Strauss, 1994; Kielian et al 2010). As proteínas clatrininas formam um envoltório na vesícula endocítica contendo uma estrutura composta por três eixos que ao unir as extremidades carboxi-terminais, formam um poliedro capaz de formar vesículas no citosol (Chevillon et al., 2008; Bernard et al. 2010).

O genoma do *Alphavirus* é caracterizado pela presença de duas fases de leitura aberta (*Open Reading Frame*, ORF), ORF1 e ORF2. Essas fases contêm 7,422 e 3,744 nucleotídeos, e codificam proteínas não estruturais e estruturais, respectivamente, que são conectados por um promotor 26S para a síntese do RNA subgenômico (Kamrud et al. 2010). Em seguida, o RNA viral livre é traduzido em uma poliproteína, no qual as proteases virais irão clivá-lo sucessivas vezes, originando quatro proteínas não estruturais (nsP1–4) (Li et al. 2012).

A poliproteína precursora não estrutural codificada pela ORF1 contém quatro proteínas, a saber, nsP1 (535 aminoácidos, envolvidos na atividade de *capping* e GTPase); nsP2 (798 aminoácidos, possui atividade 5' RTPase, helicase e protease); nsP3 (530 aminoácidos, é uma proteína acessória que recruta fatores da célula hospedeira que participam e otimizam o processo replicativo) e; nsP4 (611 aminoácidos, é a RNA polimerase dependente de RNA viral, (*RNA dependent RNA polymerase, RdRp*), considerada a enzima chave do complexo de replicação do CHIKV, e atua principalmente por promover a síntese e alongamento do RNA viral). Existem alguns estudos sobre a estrutura tridimensional das proteínas nsP2, região de protease; nsP3, porções N-terminais dobrados e; nsP4 (Shin et al. 2012; Pietilä et al. 2017; Singh et al. 2018; Freire et al. 2022) (Figura 3).

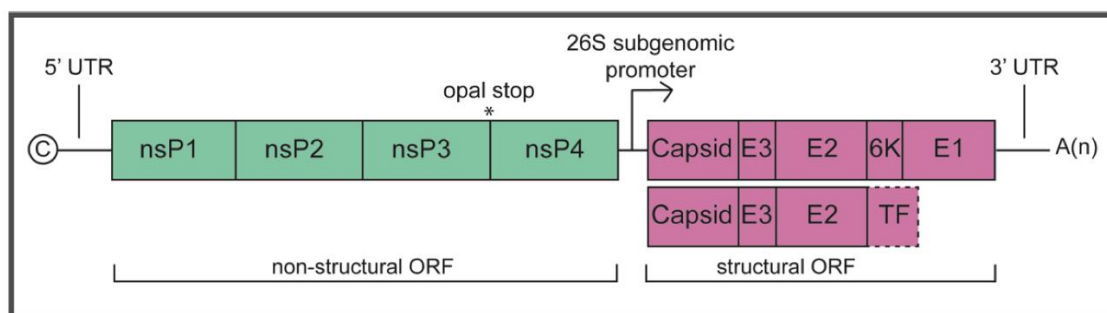


Figura 3. Diagrama esquemático do genoma do *Alphavirus*. O genoma de RNA de sentido positivo tem cerca de 11,5 kb de comprimento e contém duas ORF's: a ORF-1 que codifica as proteínas não estruturais (nsP1-4); e ORF-2 para proteínas estruturais (C, capsídeo; E1/2/3, glicoproteínas do envelope e 6 K, uma proteína de 6 kDa). UTR, região não traduzida; 26S, promotor subgenômico; A(n), poliA. Fonte: Rangel & Stapleford (2021).

As nsPs unem-se formando um complexo de replicação funcional, que possibilita a transcrição do RNA viral em uma fita de RNA com polaridade negativa, apresentando o tamanho complementar ao genoma a qual será molde de replicação para síntese do RNA genômico e o subgenômico (Strauss & Strauss, 1994). A poliproteína precursora estrutural codificada por ORF2 é precursora das proteínas estruturais (C, E3, E2, 6k e E1), que irão se tornar proteínas estruturais maduras (Lum & Ng, 2015).

É sabido que a proteína p62 é o precursor de E2, denominado p62 em *Alphavirus semliki* (SFV) e pE2 em SINV (Riezebos-Brilman et al. 2006). Após a internalização do genoma viral na célula hospedeira, o pH da vesícula endocítica torna-se cada vez mais ácido durante a maturação do endossomo. Essa mudança permite que o pH baixo desencadeie uma série de mudanças conformacionais no envelope, possibilitando que o heterodímero E2/E1 se reestruture e apresente o peptídeo de fusão E1 na membrana

endossomal, auxiliando na fusão entre as membranas e a liberação do nucleocapsídeo no citosol (Sourisseau et al. 2007; Kielian et al. 2010; Lum & Ng, 2015).

O RNA viral é traduzido para produzir as proteínas não estruturais (nsP1–4), que após várias etapas, montam um complexo de replicação para produzir mais cópias de RNA por meio de um RNA de sentido negativo (Kielian et al. 2010; Pietilä et al. 2017). A proteína do capsídeo viral (C) é a primeira a ser traduzida e se auto cliva da poliproteína estrutural. Após, a proteína C, empacota o RNA e monta a estrutura chamada nucleocapsídeo (NC), e sinais e domínios transmembrana medeiam a translocação e a organização geométrica de pE2, 6K e E1 no retículo endoplasmático (Hashimoto et al. 1981). Uma vez clivadas, ocorre a modificação pós-traducional dessas proteínas de forma individual durante o deslocamento pela via secretora trans-Golgi. Para proteger a proteína E1 da exposição ao pH baixo, pE2 e E1 formam um heterodímero (Glomb-Reinmund & Kielian, 1988; Mulvey & Brown, 1994). No final da via secretora, a enzima proteolítica furina cliva pE2 produzindo E3 e E2 maduros.

De acordo com Leung et al. (2011), a proteína 6k foi classificada como uma viroporina, devido a capacidade de formar canais de íons catiônicos e alterar a permeabilidade da membrana. A função desta proteína está relacionada com a montagem das partículas virais, sinalizando para que ocorra a translocação de E1. Dentro da região codificadora 6K, o *frameshifting* do ribossomo causa a tradução de uma ORF correspondente a proteína de transmembrana (De Curtis & Simons, 1988; Klimstra et al. 1999; Firth et al. 2002). Por fim, o RNA e as proteínas estruturais formam a partícula viral na membrana plasmática e são excretadas para fora da célula por brotamento (Figura 4).

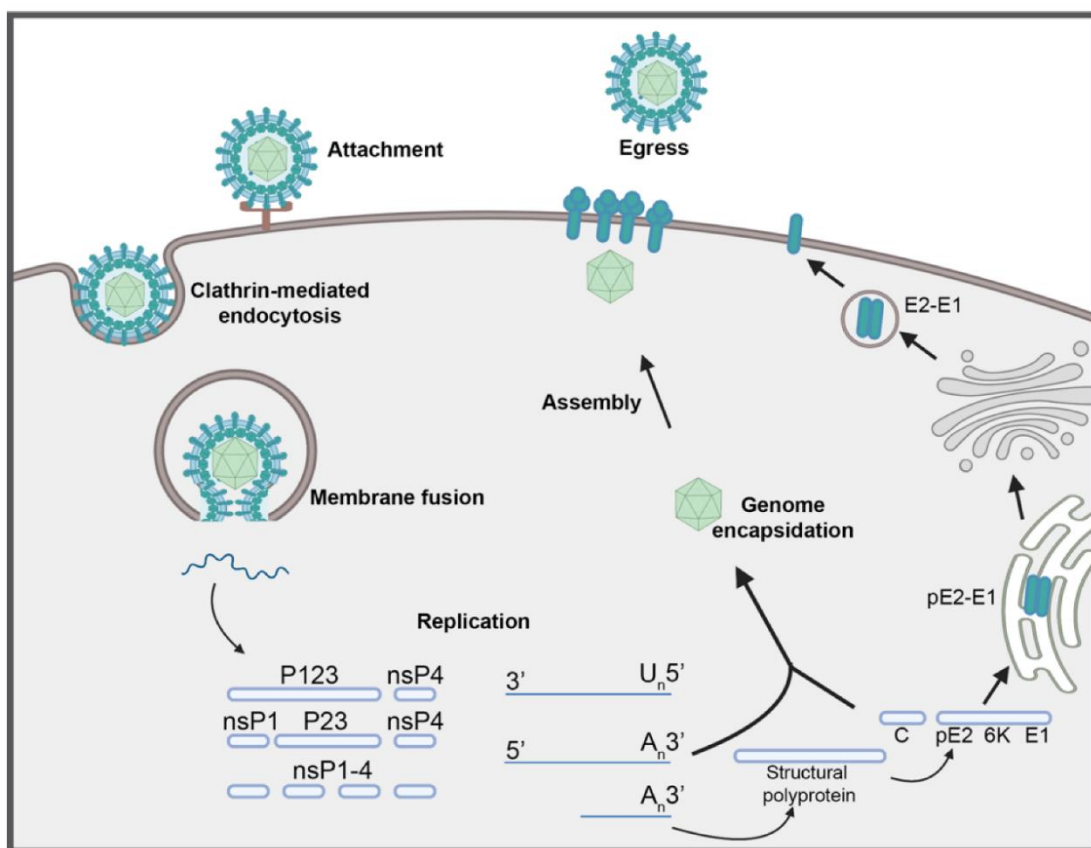


Figura 4. Representação esquemática da replicação de um *Alphavirus*. Ligação ao receptor de membrana, endocitose (acidificação da vesícula), fusão de membrana, processamento da ORF-1 (replicação, transcrição e tradução), processamento da ORF-2 (maturação de glicoproteínas, transporte de glicoproteínas processadas e ativação por furina), empacotamento do genoma viral, montagem do nucleocapsídeo, e brotamento dos vírions. Fonte: Rangel & Stapleford (2021).

1.3 Desenvolvimentos recentes em vacinas contra *Alphavirus*

Algumas vacinas experimentais com vírus inativados e vírus atenuados podem ser estabelecidos a partir do vírus parental virulento. Através da engenharia genética outras vacinas estão em desenvolvimento, permitindo um design mais avançado, como vacinas de vetores virais, partículas pseudovirais (*virus like particles*), vacinas de subunidades e vacinas de ácido nucleico (Schmidt & Schnierle, 2022).

Entretanto, devido aos surtos de infecções por CHIKV, manter a taxa de eficácia da vacina é um desafio, principalmente por causa da mutação do vírus, a mutação entre as diferentes linhagens existentes alterarem a eficácia da vacina, a resposta imunológica variável quando o indivíduo é exposto a outra linhagem do vírus, ao decréscimo ao longo do tempo da imunidade induzida pela vacina, aos desafios das políticas sociais em distribuir a vacina e monitorar a vacinação e, a interação da vacina com outras doenças

que pode afetar diretamente à resposta imunológica ao CHIKV (DeFilippis, 2019; Gao et al. 2019; De Lima et al. 2022; Cai et al. 2023; Maure et al, 2024).

Embora existam muitas vacinas candidatas em ensaios clínicos, ainda não há vacinas ou terapias antivirais comerciais contra *Alphavirus chikungunya* e *Alphavirus mayaro* licenciada no Brasil (Erasmus et al. 2016; Babaeimarzangou et al. 2023; Bueger et al. 2025). Entretanto, recentemente a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, cedeu uma licença em novembro de 2023 da primeira vacina contra CHIKV (Ixchiq®, Valneva). Além da vacina recentemente licenciada, Ixchiq®, Maure, et al. (2024) destacam as cinco principais vacinas anti-CHIKV que progrediram para ensaios clínicos, e estão ativamente em desenvolvimento desde setembro de 2024 (Figura 5).

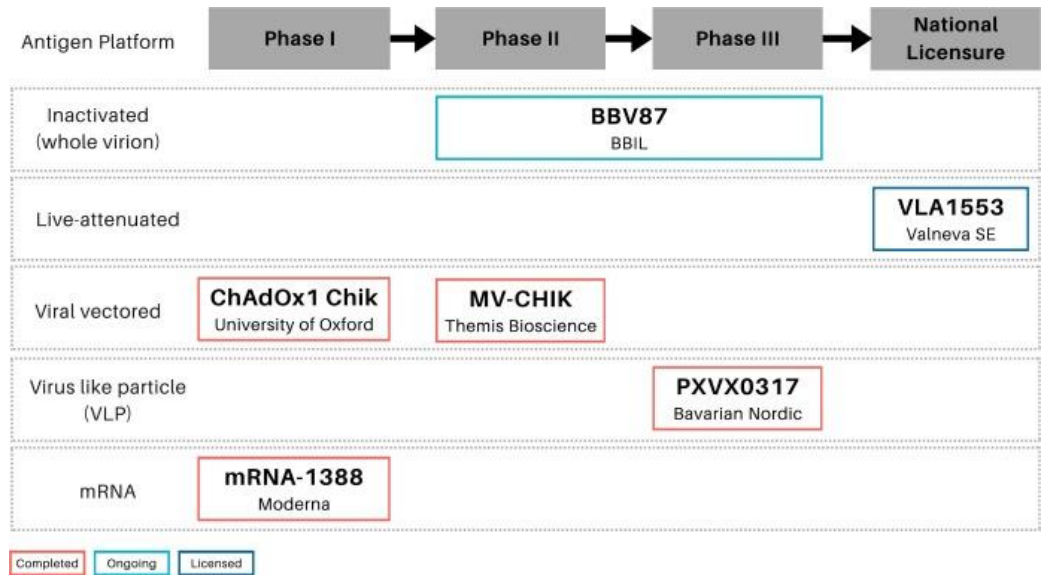


Figura 5. Vacinas anti-Chikungunya. A vacina licenciada contra Chikungunya (Ixchiq – VLA 1553) e novas vacinas no *pipeline* de desenvolvimento clínico são ilustradas por plataforma de antígeno, fases de ensaios clínicos e licenciamento. BBIL - Bharat Biotech International Limited. Fonte: Maure et al. (2024).

1.4 Vírus Chikungunya (CHIKV)

O CHIKV é um *Alphavirus* que apresenta mecanismo de transmissão semelhante ao DENV– através da picada da fêmea dos mosquitos do gênero *Aedes* e *Culex*. Foi isolado pela primeira vez em 1952 na África Oriental, atual Tanzânia, após um surto de doença febril. Entretanto, há registros clínicos nos séculos 18 e 19, além de análises do relógio molecular dos genomas atuais, sugerindo a infecção desse vírus em humanos há aproximadamente 300 anos (Volk et al. 2010; Halstead et al. 2015). Através da análise da identidade da sequência de aminoácidos da proteína do envelope E1, três linhagens virais

distintas foram reveladas: o cluster asiático, o cluster da África Ocidental e o cluster do centro-leste e sul-africano (Chevillon et al. 2008; Presti et al. 2012).

No final da década de 50, o CHIKV também foi isolado em Uganda e na África Central, e a análise filogenética dessas sequências isoladas destas regiões, permitiu a classificação inicial do CHIKV, agrupando-os na linhagem da África Oriental, Central e Sul (ECSA) (Ross, 1956; Weinbren et al. 1958; Powers et al. 2000). Entre as décadas 50 e 80, acredita-se que o CHIKV migrou da África para a Ásia, pois neste período, foi relatado o aparecimento de uma doença causando sintomas febris, portanto cogita-se que inicialmente o surgimento da febre do chikungunya foi confundida com a febre da dengue, causada pelo DENV. Posteriormente, análises genéticas confirmaram um novo genótipo do CHIKV, colocando-os em um grupo distinto, chamado linhagem asiática (Powers et al. 2000; Volk et al. 2010; Halstead et al. 2015).

Em 2004, surgiu uma sublinhagem do Oceano Índico (IOL) proveniente de um clado da ECSA, seguido por uma grande epidemia que resultou em mais de um milhão de casos suspeitos no sudeste asiático, principalmente em Singapura, Malásia, Tailândia, e na Ilha da Reunião em 2005 (Schuffenecker et al. 2006). A ampla circulação do CHIKV na Ásia e a maior replicação em *Ae. albopictus*, pode ser explicada devido a uma mutação do aminoácido alanina para valina na posição 226 (A226V) da glicoproteína E1. Esta mutação facilita a entrada do vírus em pH baixo e regula a dependência de colesterol durante o processo de fusão vírus-célula hospedeira, tornando-o mais infeccioso até mesmo em países de clima temperado, como França e Itália (Tsetsarkin et al. 2007; de Lamballerie et al. 2008; Weaver et al. 2020).

Devido a abundância de *Ae. aegypti* na América Central, em dezembro de 2013, houve um surto de febre de chikungunya que começou na Ilha Saint Martin, região do Caribe. O genótipo asiático originário da Micronésia foi introduzido ao Mar do Caribe, espalhando-se rapidamente pela América Central e do Sul no final de 2014. Ainda no final de 2014, o genótipo ECSA também foi identificado no Brasil (Honório et al. 2018; Tan et al. 2018). Em 2016, iniciou-se um novo surto de CHIKV no Paquistão e na Índia, estendendo-se até Bangladesh do ano seguinte. Ainda em 2017, casos de CHIKV foram relatados na Quênia e Itália, e desde 2018 há relatos na Tailândia (Aamir et al. 2017; Venturi et al. 2017; Rahman et al. 2019; Jain et al. 2020; Phadungsombat et al. 2020).

Matusali e colaboradores (2019) discutem sobre a existência um tropismo entre CHIKV e células aderentes humanas como células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e macrófagos, replicando-se também em algumas células satélites musculares.

Resumidamente, após a picada do mosquito, o CHIKV se replica na pele (nos fibroblastos) e depois se dissemina pela corrente sanguínea para o fígado (células endoteliais), articulações, músculos (células satélites e fibroblastos), bem como para as células estromais e macrófagos do tecido linfóide, e células epiteliais e endoteliais do sistema nervoso central (Zhang et al. 2018).

O termo “chikungunya” provém da língua maconde (Shimakonde) que é um dos idiomas falados pelo povo Maconde no sudeste da Tanzânia, no qual significa “tornar-se curvado”, atribuído ao modo em que o paciente infectado por CHIKV se apresenta, devido a dor articular intensa (de Góes Cavalcanti et al. 2022). Entre 2 e 6 dias após a picada do vetor infectado com CHIKV, o paciente apresenta a tríade clássica de sintomas: febre alta ($>38,9^{\circ}\text{C}$), artralgia e exantema. Podendo existir alterações do sistema nervoso central, como convulsões, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré. Além de outras doenças como miocardite, insuficiência hepática em pacientes com antecedentes de doença hepática crônica, alterações endócrinas, pancreatite e insuficiência respiratória, embora com menor frequência (Rodriguez et al. 2019).

Existem também queixas gastrointestinais, náuseas e vômitos de 7 a 10 dias. A dor intensa nas articulações ocorre em 100% dos pacientes, e a poliartrite grave se desenvolve progressivamente, aparecendo em 80 a 90% dos pacientes nos primeiros três meses. Alguns dos pacientes sofrem com o estágio crônico da doença manifestada por artrite crônica, tais fatores ou mecanismos genéticos que desencadeiam essa reação não são bem definidos na literatura. Apesar da febre do chikungunya ser uma doença autolimitada, a artrite crônica pode resultar em destruição e prejudicar a qualidade de vida (Kucharz et al. 2012; Tan et al. 2018; Amaral et al. 2020).

Conforme o boletim epidemiológico volume 55, nº 11, referente à semana epidemiológica (SE) nº 1 a 26 de 2024, no qual o Ministério da Saúde, Brasil (2024), registrou 233.225 casos prováveis de febre de chikungunya no país (taxa de incidência de 114,9 casos por 100 mil hab.). Representando um aumento de cerca de 80% quando comparado com o ano de 2023, ultrapassando o limite máximo esperado para 2024. A região geográfica Sudeste apresentou 200,2 casos por 100 mil hab., seguida das regiões Centro-Oeste, com 187,6 casos por 100 mil hab., e Sul, com 108,6 casos por 100 mil hab. Com relação a taxa de positividade laboratorial geral para chikungunya no Brasil, obteve-se 10,0%, sendo 27,4% na sorologia ELISA IgM e 6,6% no RT-PCR. Acerca dos óbitos ocorridos por febre do chikungunya no Brasil nesta SE, observou-se que houve 134 óbitos confirmados, e 138 óbitos ainda estão sob investigação.

O diagnóstico da febre do Chikungunya pode ser realizado por isolamento viral, detecção de componentes virais (antígenos ou ácido nucleico) ou pela resposta imunológica do hospedeiro ao vírus (Mardekian et al. 2015; Brasil, 2022). Dentre esses métodos citados, os ensaios sorológicos de detecção e diferenciação entre anticorpos IgM e IgG são os mais utilizados, são eles: inibição da hemaglutinação, fixação do complemento, teste de neutralização, ensaio imunoenzimático de captura de IgM (MAC-ELISA) e ensaio imunoenzimático usando células infectadas como antígenos. Após 3 dias do início dos sintomas, os anticorpos IgM contra CHIKV aparecem e persistem por até 3 meses, enquanto os anticorpos IgG persistem por anos (Acosta-Ampudia et al 2018).

Clinicamente, a doença causada pelo CHIKV é semelhante a dengue, caracterizada por febre, cefaleia, mialgias, artralgias e exantemas. No entanto, ao contrário da dengue, apresenta uma sintomatologia acentuada, onde alguns pacientes descrevem vivenciar os sintomas por meses ou anos, podendo ainda evoluir para uma artropatia degenerativa (Kucharz et al. 2012; Amaral et al. 2020).

1.5 Vírus Mayaro (MAYV)

O MAYV pertencente ao gênero *Alphavirus*, possui uma epidemiologia semelhante ao chikungunya (Azevedo et al. 2009). Os sintomas variam de febre aguda leve a moderadamente grave, podendo apresentar erupção cutânea, mialgia e artralgia principalmente nos dedos, tornozelos e pulsos que podem variar de 3 a 5 dias. Entretanto, há relatos de que essas dores podem durar por até 1 ano (Auguste et al. 2015).

A primeira descoberta científica e isolamento do MAYV data de 1954, em Trindade e Tobago – ilhas nas regiões do Caribe, e desde então isolou-se o MAYV em vários países da América do Sul, como Bolívia, Guiana Francesa, Peru, Venezuela e Brasil. Um ano após a descoberta do vírus nas ilhas da região do Caribe, em 1955, ocorreu a primeira confirmação do MAYV no Brasil, na comunidade rural próximo ao rio Guamá, em Belém no estado do Pará (Causey & Maroja, 1957; Anderson et al. 1957). Cogita-se que o MAYV, agente etiológico da febre do mayaro, seja transmitido principalmente por mosquitos *Haemagogus janthinomys* (Culicidae) – o mesmo vetor transmissor do vírus da febre amarela (YFV) no sul do Brasil. Contudo, pesquisas revelaram que mosquitos *Ae. aegypti* apresentam-se potenciais vetores desse vírus (Santiago et al, 2015; Mavian et al. 2017).

Mavian et al. (2017) descrevem que as linhagens de MAYV isoladas tiveram seu genoma completo sequenciado, observando que a sequência do genoma MAYV é

altamente conservada. Apresenta genótipos – D (disperso) e L (limitado), e recentemente descobriu-se um terceiro genótipo menor, denominado N (novo), no qual a partir das análises realizadas, sugere-se que os genótipos D e L divergiram aproximadamente 150 anos atrás, enquanto o genótipo N divergiu aproximadamente 250 anos atrás (Pezzi et al 2019). O genótipo D apresenta-se em uma ampla área, desde as ilhas caribenhas até o Brasil, Peru, Venezuela e Bolívia. Já o genótipo L foi obtido de isolados adquiridos entre os anos 1955 e 1991 no Haiti e no Brasil, nos estados do Pará e São Paulo (Auguste et al. 2015; Blohm et al. 2019).

Por pertencerem a mesma família, o MAYV tem as mesmas características estruturais do CHIKV. São vírus que apresentam envelopes com uma camada lipídica derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. Em sua estrutura externa, existem dímeros de proteínas de subunidades diferentes que irão se transformar em trímeros, formando uma estrutura chamada espículas que são indispensáveis para a interação vírus-célula-anticorpo (Mavian et al., 2017).

Assim como o genoma de CHIKV, o genoma do MAYV possui tamanho entre 11 e 12 kb, apresentando na região não traduzida (5'UTR) as proteínas não estruturais (nsP's) e na região 3'UTR as proteínas estruturais. A codificação das nsP's ocorrem pelo RNA genômico 49S de fita simples não segmentado, com RNAm positivo que sofre poliadenilação. A codificação das proteínas estruturais ocorre através de um RNA subgenômico 26S. As nsP's têm função na produção do RNA subgenômico e na replicação do RNA viral (Hotez & Murray, 2017).

1.6 Plantas Medicinais

As plantas medicinais eram os principais recursos para o tratamento de doenças pelo homem até o século XX. Atualmente, cerca de 35% dos medicamentos em uso clínico são de origem vegetal. Portanto, mesmo com o grande desenvolvimento da química orgânica, o estudo de extratos vegetais torna-se importante, provendo o desenvolvimento de produtos biologicamente ativos para a indústria farmacêutica (Calixto, 2019). As plantas medicinais são consideradas espécies vegetais, cultivadas ou não, cujo uso tem finalidade terapêutica. A fitoterapia é definida pelo uso dessas plantas ou dos extratos de plantas com efeitos biológicos benéficos que tratam e/ou previnem diversos distúrbios de saúde (Brasil, 2014).

A utilização de plantas medicinais foi introduzida no Brasil pela população indígena, e em função da variada flora e do conhecimento etnobotânico, o país demonstra

potencial para o desenvolvimento, formulação e aplicação de fitoterápicos e fitofármacos (Braga & Côrtes, 2019; Leite et al. 2021; Zhou et al. 2021). Uma substância produzida a partir de uma planta, sem manipulação química, é denominada fitoterápico. Já um fitofármaco, compreende em um medicamento que utiliza de biomoléculas ativas, que são extraídas das plantas através de procedimentos fitoquímicos (Bhardwaj et al. 2018; Kaur et al. 2019).

Os fitofármacos podem ser extraídos de uma ampla gama de diferentes plantas herbáceas, pois possuem um amplo espectro de efeitos terapêuticos e menos efeitos colaterais negativos do que as drogas sintéticas (Américo et al. 2020). Por outro lado, muitas vezes é difícil comprovar especificamente o efeito terapêutico dos fitoterápicos devido à sua complexidade química (Pereda-Miranda et al. 2022). Por esse motivo, nos últimos anos, houve maior concentração na pesquisa científica sobre o conceito relativamente novo da combinação de medicamentos fitofármacos com nanotecnologia e biologia sintética, a fim de alcançar a sinergia de seus efeitos terapêuticos (Sajid et al. 2019; Bhattacharjee et al. 2022).

Com relação à pesquisa e desenvolvimento desses fitofármacos, conhecimentos sobre eficácia, segurança, controle de qualidade, marketing e diretrizes regulatórias, devem ser considerados (Yadesa et al. 2020; Barkat et al. 2021). Existem estudos que descrevem os prós e contras na utilização de produtos naturais como base na formulação de medicamentos. Alguns dos pontos negativos são: necessidade de estudos aprofundados para conhecer corretamente a substância ou a fração ativa de determinada planta; e exigência de controle de qualidade e padronização rígidos; bem como de estudos clínicos e toxicológicos rigorosos. Em contrapartida, produtos naturais, normalmente, são menos dispendiosos que os fármacos sintéticos; apresentam uma extensa aplicação (antifúngica, antibiótica, antitumoral e antiviral); e são propícios para o tratamento de doenças crônicas (Fokunang et al. 2020; Rudrapal et al. 2020; Barbosa et al. 2022).

1.7 Metabólitos secundários de plantas

As espécies vegetais apresentam seu metabolismo dividido, didaticamente, em metabolismo primário e metabolismo secundário. O metabolismo primário abrange as vias de síntese de carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos, comuns aos diferentes organismos, originando a bioquímica básica dos vegetais. Por outro lado, o metabolismo secundário envolve a produção de micromoléculas de estrutura complexa,

com distribuição restrita, que garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação das espécies em determinado ecossistema (Schwab, 2003).

Até o momento, existem mais de 200.000 estruturas conhecidas do metabolismo secundário de plantas, sendo que destas, mais de 30.000 pertencem a classe dos terpenos, seguido dos alcaloides que são mais de 20.000. De modo geral, os metabólitos secundários são as moléculas com potencial farmacológico, que despertam interesse na pesquisa de alternativas terapêuticas (Kutchan et al. 2015; Pandita & Pandita, 2021).

Os metabólitos secundários que promovem os efeitos terapêuticos fornecidos pelas plantas, são resultado de fatores com as variações temporais e espaciais, pois são produzidos a partir da conexão química entre a planta e o ambiente. Os fatores que podem influenciar na produção e na alteração de metabólitos secundários são: o índice pluviométrico, temperatura, altitude, sazonalidade e época da coleta, devido aos compostos não se manterem ativos por todo o ano (Ferreira et al. 2017).

As plantas que comumente são utilizadas na medicina tradicional são mais propícias a apresentarem atividade biológica, quando comparadas com plantas sem relato de utilização e aplicação prévia, ou seja, plantas colhidas por triagens aleatórias. Portanto, informações etnofarmacológicas estabelecem um padrão importante na triagem de plantas na pesquisa de produtos naturais com atividades biológicas (Berhanemeskel, 2009; Süntar, 2020).

Partindo desse pressuposto, com base no critério etnofarmacológico, a busca por agentes antivirais e antimicrobianos vem se apresentando promissora. Goh e colaboradores (2020) discutem como extratos de plantas e seus metabólitos têm sido extensivamente estudados por suas propriedades antivirais contra arbovírus, demonstrando resultados promissores. Muitos extratos vegetais e seus compostos já foram descritos na literatura por apresentarem atividade antiviral frente a *Orthoflavivirus* (DENV, JEV, WNV, ZIKV) e *Alphavirus* (CHIKV e MAYV).

Produtos do metabolismo secundário das plantas têm apresentado potencial antiviral, e alguns desses metabólitos são: alcaloides, terpenoides e polifenóis (ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas e taninos) (Ghildiyal et al. 2020). Porém, é necessária a busca por metabólitos que apresentam maior índice de seletividade (IS), ou seja, alta eficácia antiviral com baixa citotoxicidade (Indrayanto et al. 2021). Dentre os metabólitos citados na literatura, os fitoquímicos flavonoides apresentam muitas propriedades medicinais, com diferentes estudos mostrando seu potencial contra várias infecções virais humanas (Ninfali et al. 2020; Wang et al. 2020; Badshah et al. 2021).

Além dos flavonoides, podemos citar o potencial antiviral das cumarinas (Mishra et al. 2020; Xu et al. 2021), que além das plantas, podem ser encontradas em microrganismos e em animais (Aslam et al. 2010).

1.7.1 Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários que estão inseridos na classe dos compostos fenólicos ou polifenólicos, e são comumente encontrados em frutas, legumes e sementes, como resultado do estresse abiótico (Ghildiyal et al. 2020). Foram relatados mais de 8.000 compostos fenólicos provenientes de plantas, sendo que a metade desses compostos fenólicos são flavonoides (Ahmed et al. 2016). Esses fitoquímicos estão presentes em diversos fitoterápicos e têm sido relatados como tendo atividades anticancerígenas (Kikuchi et al. 2019; Ganai et al. 2021), antibacterianas (Adamkzak et al. 2019; Yuan et al. 2021), anti-inflamatórias (Maleki et al. 2019; Tian et al. 2019; Xu et al. 2019), antioxidantes (Chen et al. 2020; Kiani et al. 2021), cardioprotetoras (Santos & Braga, 2021; Syahputra et al. 2022), e auxiliadoras do sistema imune (Hoensch et al. 2018; Hosseinzade et al. 2019), demonstrando alto potencial para indústria farmacêutica (Jucá et al. 2020).

O principal fator para a fito-produção de flavonoides está associado à exposição da planta aos raios ultravioleta (UV), pois são fonte de espécies reativas ao oxigênio (*Reactive oxygen species*, ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) e oxigênio singlete (O_2) (Dias et al. 2021). Devido a afinidade desses radicais de doar ou receber elétrons, o desemparelhamento de um elétron resulta em alta reatividade, aumentando a atividade pró-oxidante sobre a atividade antioxidante, provocando um estresse oxidativo. O equilíbrio na reatividade é de suma importância para manter as funções vitais da bioquímica celular vegetal. Portanto, a capacidade dessas plantas de produzirem moléculas que eliminam os radicais livres, por filtrar os raios UV e neutralizar as ROS's, é uma prioridade para o seu desenvolvimento (Carletti et al. 2014; Zaidun et al. 2018).

A estrutura geral dos flavonoides consiste em um núcleo *flavilium* que consiste em três anéis fenólicos. O primeiro anel de benzeno (A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (C), no qual carrega na posição 2 um grupo fenil como substituinte (B). Portanto, o terceiro anel (B) pode se apresentar como um pirano heterocíclico que origina as estruturas básicas das leucoantocianidinas, que são precursores das antocianidinas (Figura 6 A). Além disso, este pirano pode originar as

antocianidinas, denominado de núcleo flavana (Panche et al. 2016). A formação de subclasses de flavonas, flavonois, flavanonas, flavanois, antocianinas e isoflavonas ocorre devido ao terceiro anel apresentar-se como uma pirona, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonoide (Figura 6 B - G) (Karak, 2019; Alseekh et al. 2020).

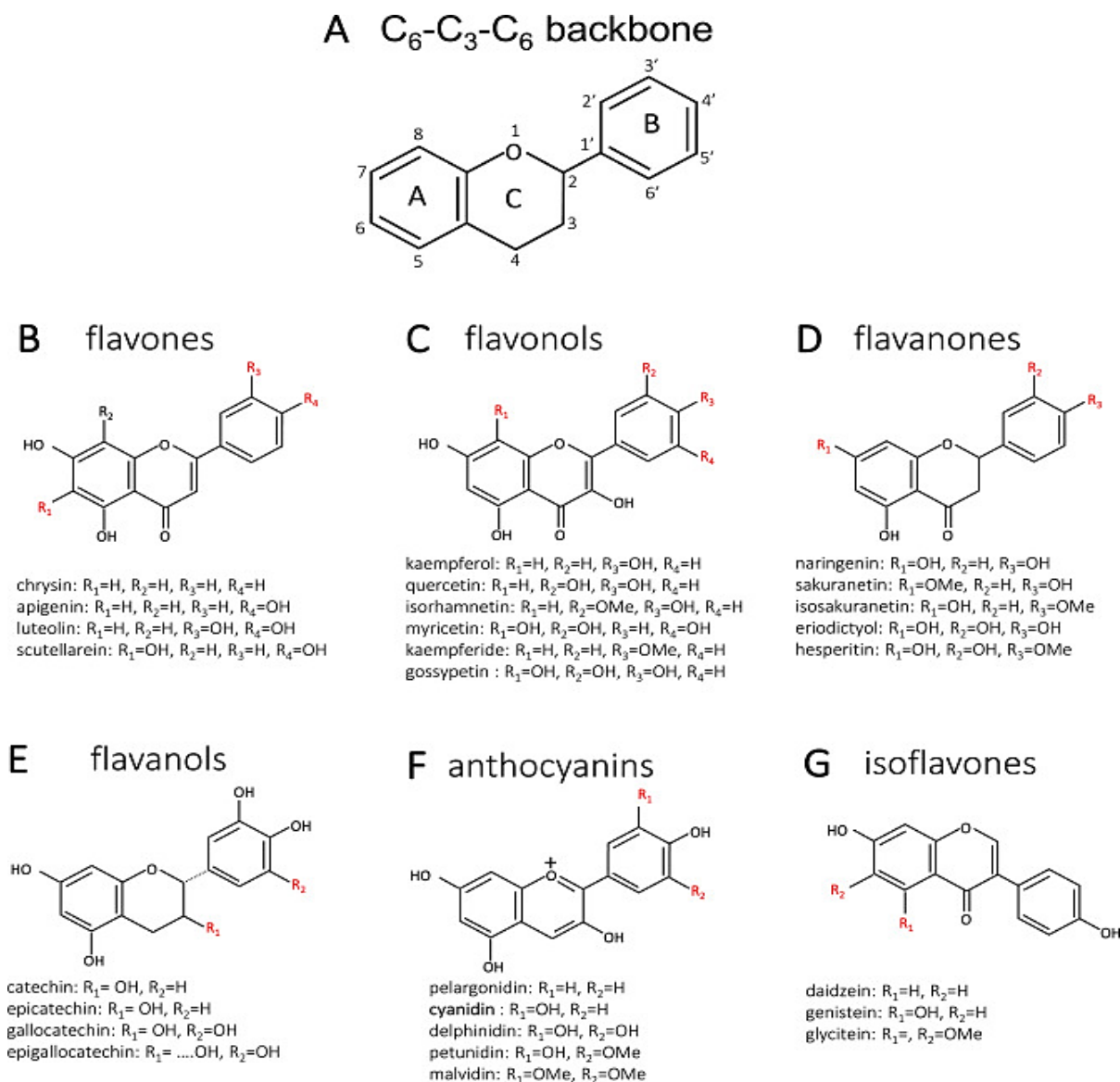


Figura 6. A) Estrutura dos principais flavonoides agliconas. **B)** Flavonas, **C)** Flavonois, **D)** Flavanonas, **E)** Flavanois, **F)** Antocianinas e **G)** Isoflavonas. Fonte: Alseekh et al (2020).

1.7.2 Cumarinas

Assim como os flavonoides, as cumarinas também estão inseridas na classe dos compostos fenólicos ou polifenólicos, pertencendo a família das benzopironas, podendo ocorrer na natureza de forma livre ou combinada com o açúcar glicose (glicosídeo

cumarínico). Devido ao seu aroma doce, tem sido utilizada na formulação de perfumes desde 1882 (Floc'h et al. 2002; Aslam et al. 2010).

Embora sejam encontradas em todas as partes da planta, ocorrem em níveis mais elevados nos frutos, sementes, raízes, folhas e látex, respectivamente. Além disso, este composto pode ser encontrado em grande quantidade nos óleos essenciais de plantas, como a lavanda (*Lavandula angustifolia*) e a canela (*Cinnamomum verum*) (Venugopala & Odhav 2013). Cerca de 1.300 quimiotipos de cumarinas foram reconhecidos como metabólitos secundários somente em plantas (Rawat & Reddy, 2022). As cumarinas, em geral, possuem atividades biológicas, como anticoagulante (Kraimi et al. 2021), antifúngica (Ferreira et al. 2022), antibacteriana (Sahoo et al. 2021), antiviral (Yusufzai et al. 2018; Hwu et al. 2019; Xu et al. 2021), anti-inflamatória (Saadati et al. 2024) e antitumoral (Rawat & Reddy, 2022).

A biossíntese de cumarinas pelas plantas ocorrem principalmente pela necessidade de defesa a pragas, como vírus e fungos. Além disso, muitas das cumarinas agem como compostos anti-herbivoria, enquanto a maioria participa da manutenção do equilíbrio redox através da eliminação de ROS (Jan et al. 2021). Quanto a sua estrutura química, cumarinas naturais são lactonas insaturadas que pertencem à classe química C₆C₃, ou seja, uma classe de benzopironas (1,2-benzopironas ou 2H-1-benzopiran-2-onas, consistindo em um anel benzênico fundido a um anel α -pirona), que podem ser consideradas estruturalmente como derivados do ácido *orto*-hidroxicinâmico. No que envolve a classificação das cumarinas, podem ser divididas nos seguintes grupos: cumarinas simples, furanocumarinas, diidrofuranocumarinas, piranocumarinas (lineares e angulares), fenilcumarinas, bicumarinas e glicosídeos de cumarina (Figura 7) (Aslam et al. 2010; Oliveira-Alves et al. 2024)

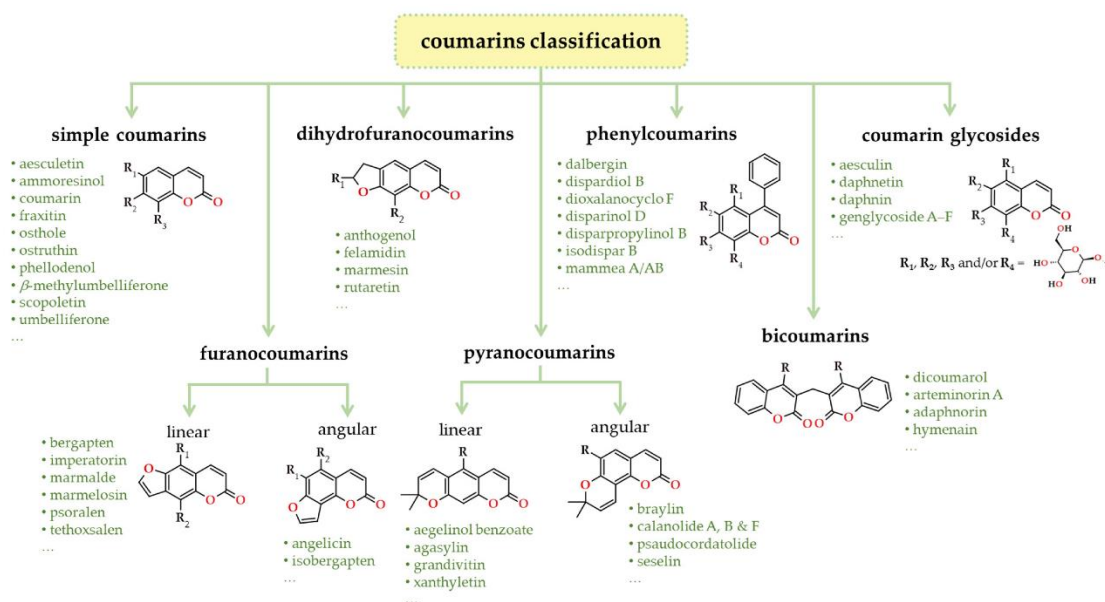


Figura 7. Classificação geral das principais categorias de cumarinas derivadas de plantas (alguns exemplos estão descritos em verde). Fonte: Oliveira-Alves et al. (2024).

1.8 Plantas medicinais do Cerrado

Localizado na região central do Brasil, abrangendo uma área de cerca de 2.000.000 km², o Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, apresentando uma ampla diversidade ecológica. De acordo com sua fitofisionomia, o Cerrado divide-se em Cerrado *stricto sensu*, o Cerradão, as Matas de Galeria, o Campo Sujo e o Campo Limpo. Essa divisão ocorre devido a fatores como o clima, características do solo, profundidade do lençol freático, incidência de fogo e a história local (Cassino et al. 2015). A maioria das espécies vegetais nativas do Cerrado correspondem a aproximadamente 5% da diversidade mundial. Apesar disso, é um dos 25 *hotspots* globais, ou seja, é uma das áreas naturais do planeta Terra que possuem uma grande diversidade ecológica e que estão em risco de extinção (Santos et al. 2020).

Infelizmente, as mudanças climáticas têm contribuído para alto impacto na biodiversidade e potencialmente têm causado o colapso dos ecossistemas, devido a grandes incêndios relatados nas últimas décadas. Com objetivo de proteger essas áreas, os efeitos da temperatura e umidade nos ecossistemas do Cerrado não podem ser negligenciados e devem ser mais explorados sob a ótica do uso da terra (Latrubesse et al. 2019; Hofmann et al. 2021).

O bioma abriga uma das maiores diversidades biológicas de espécies vegetais, principalmente quando se trata de plantas com potencial medicinal, mas poucas dessas

espécies foram estudadas por suas propriedades medicinais. O bioma Cerrado possui mais de 7.000 espécies de plantas nativas, ocupando cerca de 24% da área do Brasil: 100% do Distrito Federal, 97% de Goiás, 91% do Tocantins, 65% do Maranhão, 61% do Mato Grosso do Sul e 57% de Minas Gerais, além de outras áreas menores. Atualmente, o Cerrado tem sido alvo de estudos de bioprospecção, incluindo a triagem de vários extratos e óleos essenciais com potencial atividade antimicrobiana (da Cruz et al. 2022; da Silva Vargem et al. 2022).

Na maioria das regiões brasileiras menos desenvolvidas, as informações sobre o uso medicinal de plantas são geralmente empíricas, passadas entre gerações, e esse método ainda persiste em áreas rurais do Cerrado brasileiro. Entretanto, poucos são os estudos etnobotânicos, e pouco se sabe sobre a relação entre o uso tradicional como medicamento, com evidências científicas recentes, especialmente no que diz respeito a seus fitoquímicos e atividade farmacológica *in vitro* (Neto et al. 2020; da Cruz et al. 2022). Na tabela 2, estão descritas informações importantes referentes as seis espécies vegetais utilizadas para realização dessa tese.

Tabela 2. Principais características de seis plantas do Cerrado ricas em polifenóis.

Nome científico	Sinonímias	Família	Nome popular	Uso na medicina popular	Metabólitos secundários	Número de registro da espécie (Voucher)	Referências
<i>Chiococca alba</i> (L.) Hitch	<i>C. brachiata</i> R. P.; <i>C. anguifuga</i> Mart.; <i>C. racemosa</i> H.B.K.; <i>C. paniculata</i> Willd.	Rubiaceae	Cainca, cruzeirinha, cipó-cruz, caninana, raiz-preta, raiz-de-frade, quina-preta, raiz-de-serpentária	A infusão das raízes é utilizada como antipirético, laxativo e eméticos	Glicosídeos cardiotônicos, saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides, cumarinas, lignanos (matairesinol), hidroxicetonas, iridoides, merilactona, triterpenos e D-manitol	Universidade Federal do Tocantins (HTO-11.160)	Schapoval et al. (1983); El-Abbadi et al. (1989); Abd El-Hafiz et al. (1991); Carbonezi et al. (1999); Borges-Argaéz et al. (2001); Gazda et al. (2006); Borges et al. (2009)
<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	<i>Stenocalyx dysentericus</i> Berg; <i>Myrtus dysenterica</i> M.	Myrtaceae	Cagaita e cagaiteira	Seus frutos são conhecidos por sua atividade laxativa, enquanto suas folhas são utilizadas no tratamento de disfunções intestinais e icterícia	Taninos, flavonoides (catequina, epicatequina, quercetina, procianidina), terpenos, saponinas, ácido elágico, ácido ascórbico, retinol e licopeno	Universidade de Brasília (UB 914)	Duarte et al. (2011); Lima et al. (2011); Oliveira et al. (2011); Stefanello et al. (2011); Cecílio et al. (2012); Silva, (2016); Sardi et al. (2017); Donado-Pestana et al. (2018).

<i>Erythroxylum suberosum</i> A. St. Hil	<i>E. testaceum</i> ; <i>E. areolatum</i>	Erythroxylaceae	Fruta-de-pomba, mercúrio do campo e mercureiro	O chá das folhas é utilizado anti-reumatismo, anestésico e para indigestão	Alcaloides tropânicos, flavonoides (rutina, catequina e epicatequina), ácido cafeico, terpenos e taninos	Universidade de Brasília (CW 2192)	Barbosa e Pinto (2003); Guarim Neto e Morais (2003); Nascimento, et al. (2012); Leite et al. (2014); Elias, et al. (2015); Barros et al. (2017)
<i>Sapindus saponaria</i> L.	<i>S. indica</i> Poir.; <i>S. marginatus</i> Willd.; <i>Cupania saponaria</i> Pers	Sapindaceae	Sabão-de-soldado, pau-de-sabão, saboneteira	O decocto das folhas é utilizado como calmante, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo do sangue, cicatrizante, combate a tosse, antifúngico, larvicida e hemostático	Esteroides, taninos, flavonoides e saponinas	Universidade de Brasília (UB 916)	Abdel Wahab e Selim (1985); Castro et al. (1999); Albiero et al. (2001); Barreto et al. (2006); Tsuzuki et al. (2007); Rashed et al. (2013); Gasca et al. (2020).
<i>Morus nigra</i> L.	<i>M. atrata</i> Raf.; <i>M. cretica</i> Raf.; <i>M. laciniata</i> Raf.; <i>M. petiolaris</i> Rad.	Moraceae	Amoreira-silvestre, amoreira-negra	Suas folhas e frutos são utilizados como hipoglicemiante, para abaixar os níveis de colesterol, tratar problemas	Alcaloides, cumarinas, flavonoides (antocianinas, rutina e isoquercitrina), triterpenos e	Universidade de Brasília (CW 2302)	Majinda et al. (2011); Oliveira et al. (2013); Qadir et al. (2014); Jiang et al. (2015); Chen et

				cardiovasculares, auxiliar no tratamento da obesidade, abaixar os níveis de ácido úrico no sangue, diurético, possui atividades hipotensoras e têm sido usadas para o tratamento do climatério. Além disso, é utilizada como antimicrobiana e anticâncer.	esteroides, ácido linoleico, ácido palmítico, ácido clorogênico e ácido oleico		al. (2016); Freitas et al. (2016); Oliveira et al. (2018)
<i>Miconia chamissois</i> Naudin	*	Melastomataceae	Folha de Bolo, sabiazeira e pixirica	Possui atividade antioxidante, atividade de inibição enzimática <i>in vitro</i> contra tirosinase e alfa-amilase, atividade antimicrobiana, inibição <i>in vitro</i> das atividades de MMP-2 e MMP-9 e potencial antineoplásico em linhagens celulares de câncer cervical humano	antraquinonas, triterpenoides, saponinas, taninos, esteroides, flavonoides (rutina, isoquercitrina e vitexina), alcaloides, cumarinas, miconiosídeo B, matteucinol 7-O- β -apiofuranosil (1 $\rightarrow$ 6) - β -glucopiranosídeo,	Universidade de Brasília (CWF 2358)	Alves (2016); Silva et al. (2020); Gomes et al. (2021); Ferreira et al. (2022); Rosa et al. (2022);

ácido ursólico e ácido
oleanólico

* Sinomínias não encontradas.

2 CAPÍTULO 1: Antiviral Potential of *Chiococca Alba* (L.) Hitch. Plant Extracts Against Chikungunya and Mayaro Viruses: A Preliminary Analysis

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(21), 11397; <https://doi.org/10.3390/ijms252111397>

Submission received: 17 September 2024

Revised: 12 October 2024

Accepted: 17 October 2024

Published: 23 October 2024

Abstract

Chikungunya and Mayaro fevers are viral infectious diseases characterized by fever and arthralgia, for which there are currently no effective vaccines or treatments. The urgent need for novel antiviral agents against Chikungunya virus (CHIKV) and Mayaro virus (MAYV) has led to interest in plant-based compounds that can disrupt the viral replication cycle. *Chiococca alba* (L.) Hitchc., a Neotropical plant traditionally used by Yucatec Maya healers as an antipyretic and antirheumatic, may hold potential as a source of antiviral agents. This study aimed to evaluate the antiviral potential of *C. alba* methanolic extracts (CAH21 and CAH24) against CHIKV and MAYV through preliminary *in vitro* and *in silico* analyses. The cytotoxicity of two methanolic extracts from *C. alba* roots was assessed in Vero cells using the neutral red assay, and their viral activity was determined via plaque assay post-treatment. Given the observed antiviral effects, we used computational predictions to explore interactions between the multifunctional nsP2 proteases and secondary metabolites identified in *C. alba* extracts. The metabolites were identified using high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, coumarins, and phenolic acids in the *C. alba* extracts. *In vitro* assays demonstrated that both extracts inhibited over 70% of activity against CHIKV and MAYV at a concentration of 60 µg/mL. *In silico* predictions suggested that the flavonoids naringin and vitexin had the highest affinity for the nsP2 proteases of CHIKV and MAYV, indicating their potential as viral inhibitors. Our findings revealed that *C. alba* extract represents a promising source of novel antiviral compounds.

Keywords: cainca plants; flavonoids; *Alphavirus*; viral infections; nsP2 protease

2.1 Introduction

Arbovirus-borne diseases pose significant public health challenges in many countries within the Neotropical region, frequently leading to outbreaks and epidemics [1]. Chikungunya virus (CHIKV) and Mayaro virus (MAYV) belong to the *Togaviridae* family and the *Alphavirus* genus. Both viruses are transmitted by the female mosquito of the genus *Aedes*, and their clinical manifestations resemble dengue, including fever, headache, and arthralgia [2,3,4]. *Alphaviruses* infect cells through receptor-mediated endocytosis [5]. Their genomes contain two open reading frames (ORFs): the first encodes four non-structural proteins (nsP1, nsP2, nsP3, and nsP4), while the second encodes structural proteins essential for viral assembly, including capsid (C), envelope glycoproteins (E1 and E2), and two cleavage products (E3 and 6k) [6,7]. The non-structural proteins play a crucial role in viral replication and transcription, making them prime targets for the development of antiviral drugs. Notably, nsP2 is a multifunctional protein with proteolytic activity essential for viral replication and propagation. It also facilitates the shutdown of viral gene expression when translocated to the nucleus and exhibits helicase activity, among other functions [8,9]. Additionally, nsP1 and nsP2 catalyze the capping of the negative RNA strand, while nsP3 and nsP4 are involved in replication and polymerase activities. Plant-derived compounds have been extensively studied for their antiviral properties [10,11]. Among these, secondary metabolites from various plant species have shown significant antiviral potential against multiple viruses, such as influenza, human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex virus (HSV), hepatitis, and coxsackievirus infections [12]. Examples of such metabolites include alkaloids, saponins, flavonoids, and coumarins [13]. These metabolites must exhibit antiviral activity and low cytotoxicity to host cells to be considered antiviral. Flavonoids, in particular, have garnered attention for their antiviral efficacy [14]. The Rubiaceae family, known for producing pharmacologically active secondary metabolites, such as flavonoids, alkaloids, and saponins [15,16,17], includes *Chiococca alba* (L.) Hitchc., an endemic shrub that can reach a height of 6 m; it is found in the American continent and is commonly known in Brazil as “Cainca” [18,19]. Traditional healers of the Yucatec Maya in southern Belize, Central America, have used the infusion of *C. alba* roots to treat fever, colds, muscle pains, rheumatism, asthma, and inflammations and as antimicrobial and insecticidal/repellent agents [20,21,22,23,24].

Considering the symptoms of intermittent fever caused by CHIKV and MAYV infection and the ethnobotanical knowledge of the Yucatec Maya, this study aimed to evaluate the efficacy of methanolic extracts from *C. alba* roots as a potential antiviral agent against CHIKV and MAYV *in vitro* using Vero cells. Additionally, we analyzed the *in silico* interactions between flavonoids (naringin and vitexin), which were identified in the *C. alba* extract, and the CHIKV and MAYV nsP2 proteases.

2.2 Results

2.2.1 Total Chemical Profiles of *C. alba* CAH21 and CAH24 Extracts

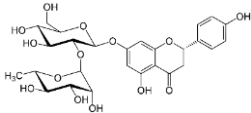
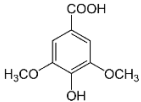
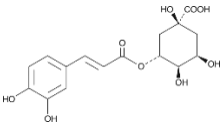
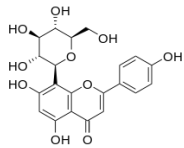
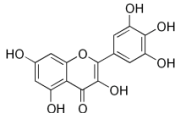
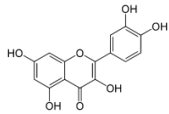
The composition and identification of the compounds present in the methanolic root extracts of *C. alba* are shown in Table S1, and the GC-MS chromatograms are shown in Figures S1 and S2. The GC-MS revealed 47 compounds in each extract (CAH21 and CAH24). The major compounds identified were cyclohexane, terpene, and furan class members. They were 1,2,3,5-cyclohexanetetrol (15.85%), cis-valerenyl acetate (12.77%), and 5-hydroxymethylfurfural (9.52%), respectively. Additionally, two compounds were identified in two peaks with different retention times: peaks 41 and 43, and peaks 37 and 44 (PubChem CID: 608286, 91730075).

2.2.2 Partial Chemical Profiles of *C. alba* CAH21 and CAH24 Extracts

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis revealed 28 peaks in the methanolic extract by maceration (CAH21) (Figure S3) and 21 peaks in the methanolic extract by Soxhlet (CAH24) (Figure S4). Using the available standards, the CAH21 extract was found to contain the flavonoid naringin. The CAH24 extract showed the presence of syringic acid, chlorogenic acid, and the flavonoids vitexin, myricetin, and quercetin (Table 1).

Table 1. Chemical profile of *C. alba* extracts identified by HPLC.

CAH21								
Peak	Compound	Chemical Structure	Retention Time (min)	Molecular Formula	Molar Mass (g/mol)	Area (%)	PubChem CID	CAS Number

9	Naringin		31.67	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.54	1.28	442428	10236-47-2
CAH24								
5	Syringic acid		24.25	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.17	6.27	10742	530-57-4
6	Chlorogenic acid		25.30	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	0.53	1794427	327-97-9
10	Vitexin		36.57	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.38	13.01	5280441	3681-93-4
12	Myricetin		65.23	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.23	4.13	5281672	529-44-2
14	Quercetin		75.25	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.23	16.86	5280343	117-39-5

Total compounds identified = 42.08%.

2.2.3 Cytotoxic Assay

CAH21 and CAH24 *C. alba* extracts were incubated with Vero cells for 48 h, and the CC₅₀ and CC₉₀ values were calculated using nonlinear regression (curve fit). They exhibited comparable cytotoxicity in Vero cells after 48 h (Figure 1A). The CC₅₀ values were 0.991 ± 0.0014 mg/mL and 0.887 ± 0.0012 mg/mL for CAH21 and CAH24, respectively (Figure 1B), while the CC₉₀ values were 0.260 ± 0.0001 mg/mL and 0.241 ± 0.0001 mg/mL, respectively (Figure 1C). The observed cytotoxic effects included the formation of vacuoles and cell lysis.

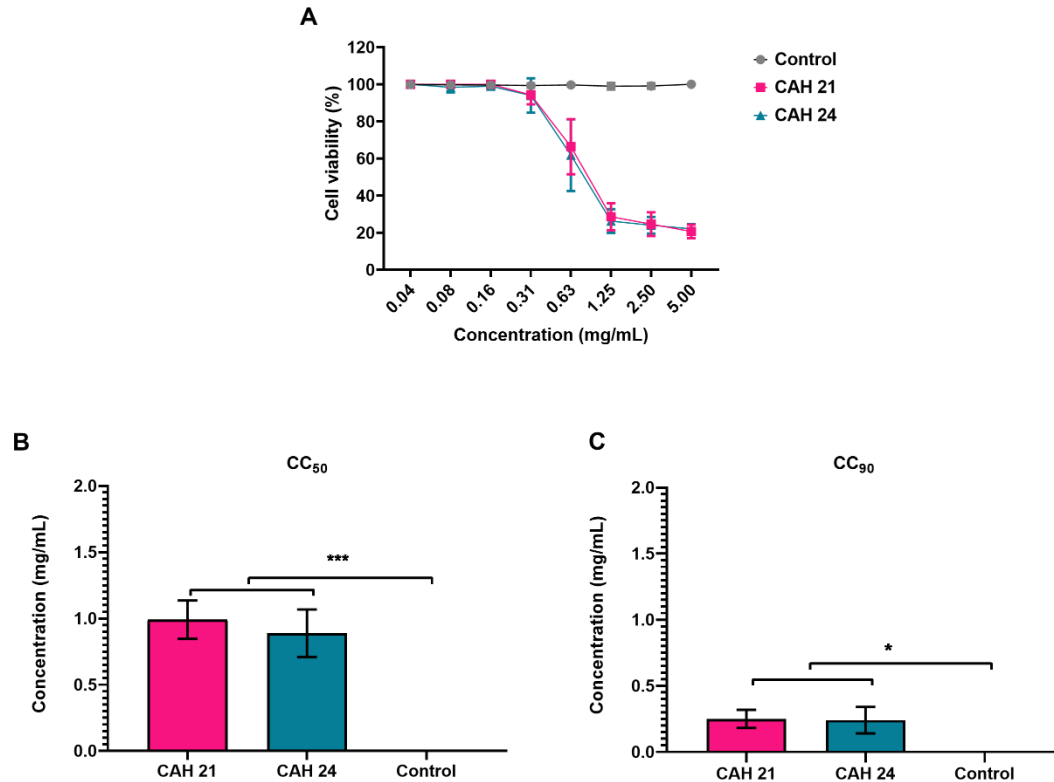


Figure 1. Cytotoxicity assay. (A) Cell viability after treatment using Vero cells, incubated for 48 h with different concentrations of *C. alba* extracts CAH21 and CAH24. (B) CC₅₀ and (C) CC₉₀ values. Ordinary one-way ANOVA multiple comparisons were used to determine statistical significance from cell control (* $p = 0.1$; *** $p < 0.001$).

2.2.4 Antiviral Activity Analysis

The antiviral assay was performed in the post-treatment step, as illustrated in Figure 2A (see Figures S5 and S6). Upon comparison, CAH21 exhibited a lower concentration for the inhibition of 50% of the virus replication for both viruses tested (see Figure 2B,D). Specifically, the reduction in CHIKV plaque formation exceeded 70% at a concentration of 60 $\mu\text{g/mL}$ for both extracts. Additionally, CAH21 at a concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ reduced plaque formation by 47% (Figure 2B).

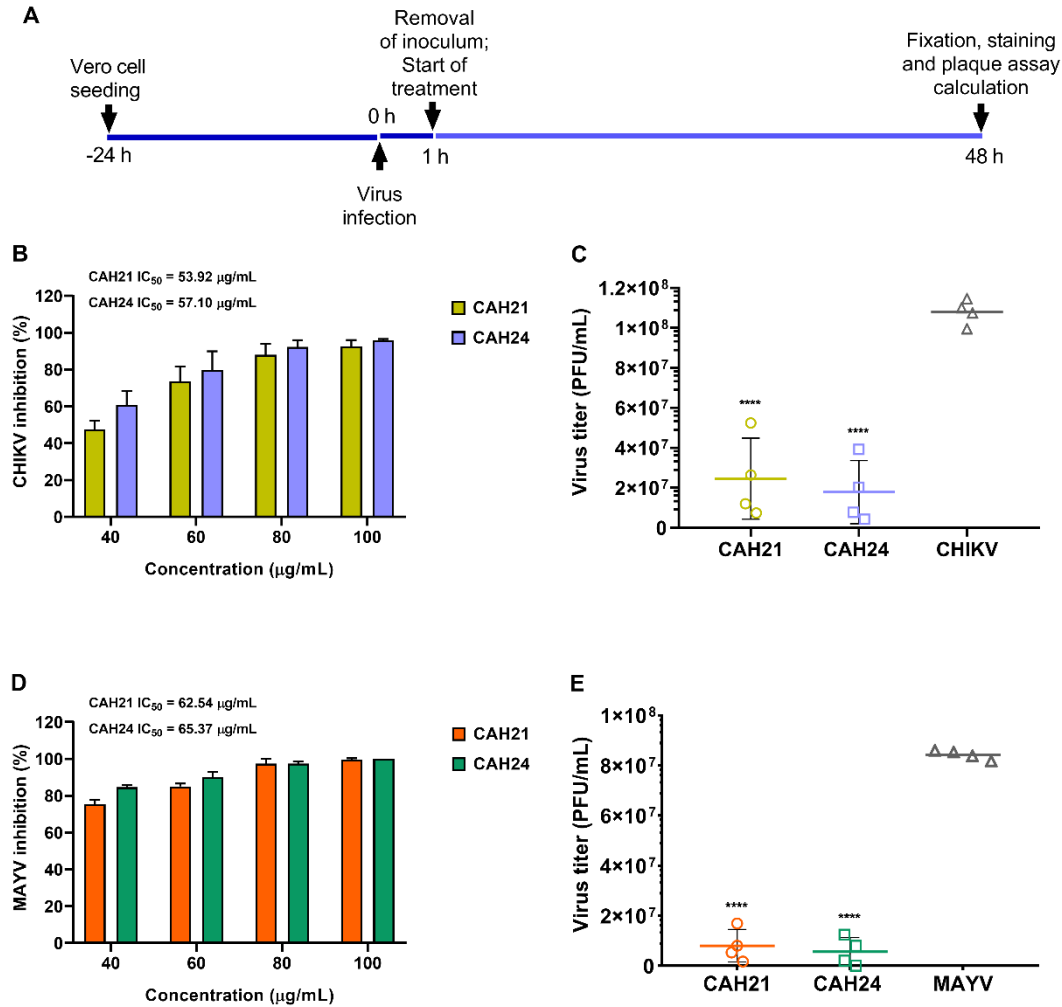


Figure 2. Antiviral activity of *C. alba* extracts against CHIKV and MAYV. (A) Schematic description of the antiviral assay. (B) Dose–response antiviral activity of *C. alba* extracts on the replication of CHIKV in a plaque reduction assay. The data are the means and standard deviations of three independent experiments. (C) The scatter dot plot shows the individual and mean values of CHIKV titer ($\log_{10}$ PFU/mL) at 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of *C. alba* extracts. (D) Dose–response antiviral activity of *C. alba* extracts on the replication of MAYV in a plaque reduction assay. The data are the means and standard deviations of three independent experiments. (E) The scatter dot plot shows the individual and mean values of the MAYV titer ($\log_{10}$ PFU/mL) at 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{g/mL}$ of *C. alba* extracts. Inhibitory concentration 50% (IC_{50}) values were calculated by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software (version 8.01) by plotting log inhibitor versus normalized response (variable slope). An ordinary one-way ANOVA with multiple comparisons was used to determine statistical significance from viral control (**** $p < 0.0001$).

The antiviral assays with the CAH24 extract exhibited a greater reduction in plaque formation compared to CAH21 (Figure 2C,E). Specifically, for the CAH24 extract, 84% and 90% inhibition of MAYV replication were observed at concentrations of 40 $\mu\text{g/mL}$ and 60 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Figure 2D). Therefore, both the CAH21 and CAH24 extracts demonstrate potential anti-MAYV and anti-CHIKV activities (Table 2).

Table 2. Cytotoxicity, selectivity index, and reduction percentage in the plaque numbers for *C. alba* extracts against CHIKV and MAYV in Vero cells after 48 h.

Plant Extracts	CC ₅₀ (µg/mL) ^a	CC ₉₀ (µg/mL) ^b	µg/mL	CHIKV % Reduction ^c	SI ^e	MAYV % Reduction ^d	SI ^e
CAH21	991 ± 0.1	251 ± 0.1	40	47.6 ± 4.6	18.4	75.3 ± 2.6	15.8
			60	73.6 ± 8.0		85.1 ± 1.5	
			80	88.0 ± 5.9		97.4 ± 2.6	
			100	92.6 ± 3.4		99.5 ± 0.8	
CAH24	887 ± 0.2	241 ± 0.1	40	60.8 ± 7.5	15.5	84.6 ± 1.1	13.6
			60	79.8 ± 10.1		90.1 ± 2.8	
			80	92.3 ± 3.6		97.5 ± 1.2	
			100	95.81 ± 0.77		100 ± 0.01	

^{a,b,c,d} Values are mean ± SD of the triplicate assay for each sample. ^a CC₅₀ values represent the means of three independent experiments. Statistical significance from cell control determined by ordinary one-way ANOVA multiple comparisons, ^b CC₉₀ values represent the means of three independent experiments ($p < 0.05$). Statistical significance from cell control determined by ordinary one-way ANOVA multiple comparisons, * = $p < 0.05$. ^{c,d} Values were calculated by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism software (version 8.01). ^e SI (Selectivity Index) = CC₅₀/IC₅₀.

2.2.5 Modeling and Validation of the MAYV nsP2 Structure

The three-dimensional structure of the MAYV nsP2 was modeled using the CHIKV nsP2 as a template (PBD ID: 4ZTB). To ensure the adequacy of the model construction, the amino acid sequences must exhibit highly similar structures, as significant disparities could compromise the functionality of the model. Ideally, this identity should exceed 30% [25,26], and we found a 67.50% identity between the model used and the protein's three-dimensional structure. Upon analysis of the Ramachandran plot, we observed that the protein structure was energetically favorable with 93.08% and a value close to zero (−0.79) for the QMEAN analysis (Figure 3A,B), indicating the good precision and quality of the model [27,28].

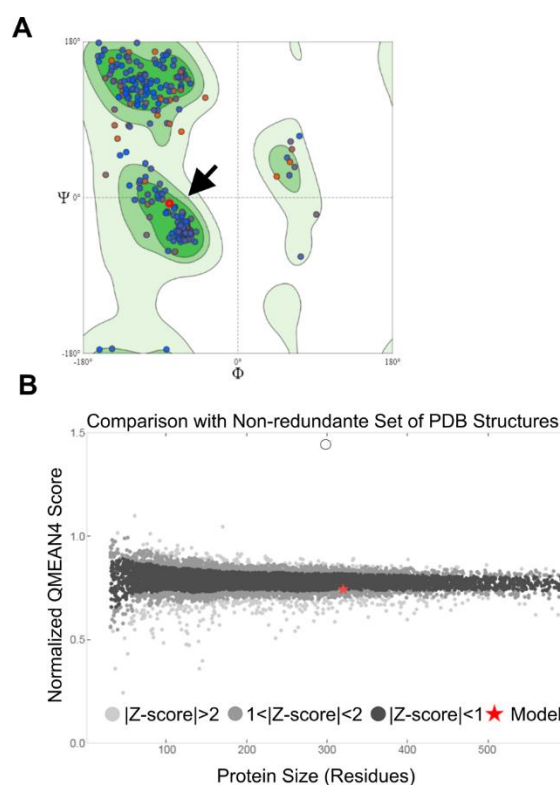


Figure 3. MAYV nsP2 structure modeling and validation. **(A)** Ramachandran's graph for MAYV nsP2. The black arrow indicates the presence of the protein in the most favorable region. Dots show where the dihedral angles of amino acids in a protein structure fall. Blue dots represent residues that adopt allowed or stable conformations according to the standard geometry of proteins, while red dots highlight residues with unusual or less favorable dihedral angles. **(B)** The QMEAN (qualitative model energy analysis) value, which describes the quality of the model. The red star indicates that the position in Z-scores presents a highly reliable structure and is within the range of scores typically found for proteins of similar size.

2.2.6 Molecular Docking

According to the *in silico* analysis, the molecules identified in the *C. alba* extracts can interact with the CHIKV and MAYV nsP2 proteins, exhibiting varying affinity energies, as detailed in Table 3. Notably, naringin and vitexin displayed strong interactions with nsP2, indicating their potential anti-CHIKV and anti-MAYV molecules, based on the best interaction energies between the molecule and receptor [29]. Molecular docking using naringin and vitexin with the nsP2 of CHIKV and MAYV was conducted to evaluate the antiviral potential of these flavonoids. This assessment was based on the hypothesis that flavonoids might disrupt the viral replication cycle, given that the post-treatment step was employed in the plaque reduction assay.

Table 3. Molecular docking results for the complexes formed between the *C. alba* extract molecules and the nsP2 proteins of CHIKV and MAYV.

Molecules	Receptor (kcal/mol) ^a
-----------	----------------------------------

	nsP2 Protease—CHIKV	nsP2 Protease—MAYV
Chlorogenic acid	−6.7	−6.8
Myricetin	−7.0	−7.1
Naringin	−7.9	−8.5
Quercetin	−7.1	−7.3
Syringic acid	−4.6	−4.9
Vitexin	−7.9	−7.9

^a Affinity energy of AutoDock Vina.

Initially, the nsP2 protease of CHIKV was targeted. Vitexin showed hydrogen bond interactions with the nsP2 active site, specifically with SER44, GLN237, and TRP80. On the other hand, the naringin–CHIKV–nsP2 complex exhibited van der Waals interactions with amino acids such as SER44, PRO204, LEU203, ALA205, and ALA76. Additionally, it displayed one pi-alkyl interaction, one pi-sigma interaction with TYR75, hydrogen carbon interactions with LEU201 and ASP229, and one pi-cation interaction with TRP80 (Figure 4A). Subsequently, the MAYV nsP2 protease was targeted. In the vitexin–MAYV–nsP2 complex, van der Waals interactions were observed with amino acids such as MET706, GLN709, SER517, VAL520, THR736, ARG735, HIS552, LEU546, GLY559, ARG560, and ALA743. Furthermore, a carbon-hydrogen interaction with TYR548, a pi-alkyl interaction with TRP553, and a pi-cation interaction with GLU519 were observed. On the other hand, the naringin–MAYV–nsP2 complex demonstrated a total of 15 interactions, including van der Waals bonds with TYR717, GLY713, GLN709, VAL520, GLU519, ARG560, LEU546, GLY559, and TYR548. Additionally, it showed carbon-hydrogen interactions with ASP714, MET710, HIS552, and SER517, as well as pi-alkyl interactions with TRP553 and LEU716 (Figure 4B).

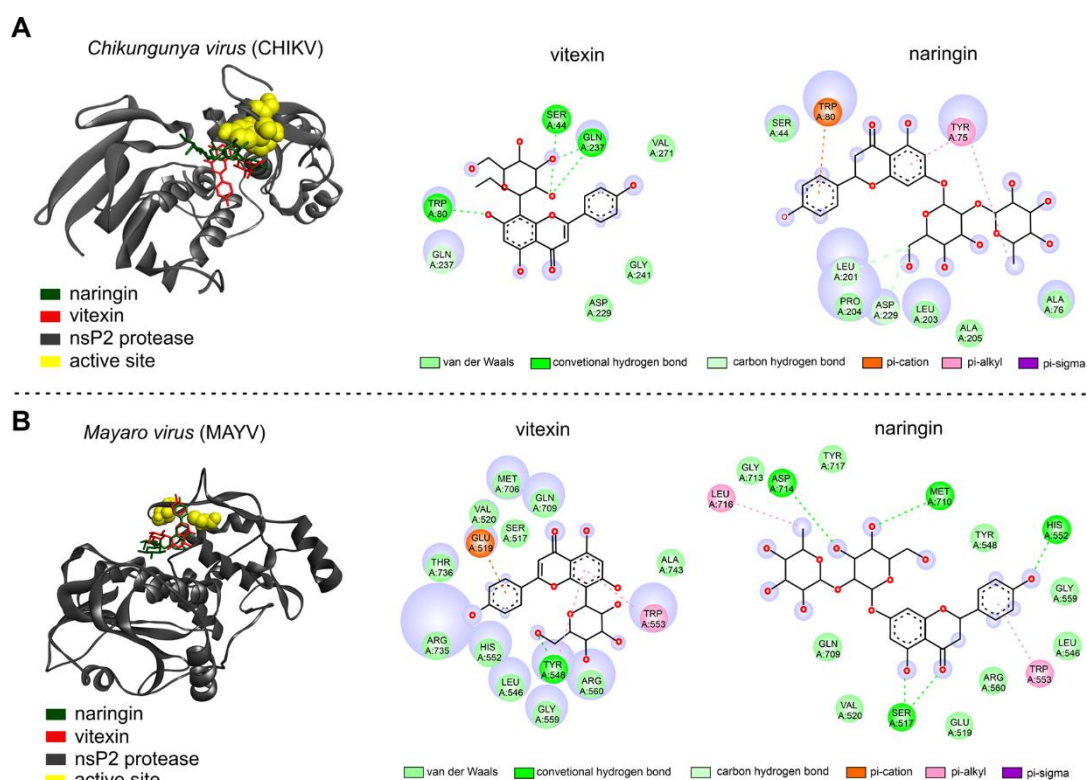


Figure 4. Molecular docking. **(A)** Complex between the nsP2 proteases of CHIKV and **(B)** MAYV with molecules of ligand naringin (green) and vitexin (red), close to the region of the active site (yellow), and a 2D interaction map with the amino acids.

2.3 Discussion

Here, we demonstrated the anti-CHIKV and anti-MAYV activities of *C. alba* methanolic plant extracts. The cytotoxicity of *C. alba* extracts to Vero cells was assessed, and a concentration–response curve was established. An antiviral drug needs to exhibit activity against the virus without inducing significant toxicity to the host cell. Therefore, investigating cytotoxicity activity is the initial step in antiviral testing. Given the crude nature of the tested extracts, the observed cytotoxic effects may be attributed to the presence and concentration of the molecules therein, as the stock solutions were prepared without organic solvents. Higher concentrations of metabolites could lead to increased cytotoxicity. Additionally, the *in silico* analyses revealed that some of these compounds interacted more effectively with the nsP2 protease of CHIKV and MAYV, suggesting a potential antiviral mechanism.

An extract exhibiting potential antiviral activity typically demonstrates a reduction in plaque formation ranging between 50 and 90% compared to controls. To be classified as antiviral, an extract should achieve a reduction of >90% [30]. The methanolic extract obtained using the Soxhlet, CAH24, displayed superior antiviral activity against

CHIKV and MAYV compared to the maceration-derived CAH21 extract but was not statistically significant. The Soxhlet extraction system maintains high temperatures throughout the process, promoting increased solubility and diffusivity of the sample [31]. Consequently, the high temperature may have allowed the obtention of antiviral metabolites in higher concentrations, though they resulted in a lower CC₅₀ when compared to the CAH21 extract.

Partial analysis via the HPLC of the *C. alba* extracts revealed 28 peaks for CAH21 and 21 for CAH24. However, due to the utilization of only 16 known standard molecules, it was possible to identify only six metabolites: chlorogenic acid, naringin, syringic acid, vitexin, myricetin, and quercetin. Therefore, GC-MS analysis was employed to identify additional compounds in *C. alba*, which included esters, fatty acids, alcohols, aldehydes, and terpenes. The results showed that GC-MS offered a simple, rapid, and susceptible method for component analysis in *C. alba* roots. The different extraction and preparation methods of the *C. alba* extracts enabled the evaluation and comparison of the profiles obtained in the cytotoxicity and antiviral tests.

We searched the literature for the three major compounds (1,2,3,5-cyclohexanetetrol, cis-valerenyl acetate, and 5-hydroxymethylfurfural) that GC-MS identified. Researchers identified the compound 1,2,3,5-cyclohexanetetrol in the hydroethanolic extract of *A. paniculata* leaves (15.10%) and in the ethanolic extract of *Clitoria ternatea* leaves (3.55%). And the studies reveal that these extracts have cardioprotective action in isoproterenol-induced myocardial infarction and nephroprotective action in acetaminophen-induced toxicity in mice, respectively. There is no data regarding the antiviral activity of 1,2,3,5-cyclohexanetetrol [32,33]. The terpene molecule, cis-valerenyl acetate, was found in oils from the roots and leaves of *Valeriana pyrolaefolia* Decne. Other investigations performed phytochemical analysis but did not test for *in vivo*, *in vitro*, and *in silico* activity. There is no investigation of the antiviral activity of cis-valerenyl acetate in the literature [34,35].

5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) is an endogenous product found in plants, in free or bound forms, and is present in a range of sugar-rich foods and traditional Chinese medicines [36]. Pharmacological studies of the components showed that 5-HMF presented good biological activities, such as anti-inflammatory activity and bacteriostatic action [37]. A recent study reported, for the first time, that 5-HMF has an immunomodulatory mechanism against vesicular stomatitis virus (VSV) infection. In

summary, these findings indicate that 5-HMF can induce type I IFN production and enhance IFN-JAK/STAT signaling in primary peritoneal macrophages [38].

To date, there are no published data on the antiviral activity of *C. alba* extracts against arboviruses. Since the specific compound or compounds responsible for the possible antiviral activity of the extracts are unknown, fractioning the different compounds present in the extract to test their antiviral activity is necessary. Based on our results, we hypothesize that the flavonoids—naringin and vitexin—found in *C. alba* might interact with viral replication enzymes; this mechanism is supported by the literature that describes flavonoids as having antiviral activity [14,39,40,41,42], particularly against arboviruses [43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53], enteroviruses [54,55], hepatitis viruses [56,57], and influenza viruses [50,58].

Other studies conducted antiviral activities using four flavonoids (quercetin, naringin, hesperetin, and daidzein) against dengue virus type 2 (DENV-2). It was demonstrated that quercetin showed an $IC_{50} = 35.7 \mu\text{g/mL}$, while naringin exhibited an IC_{50} of $168 \mu\text{g/mL}$ when used before virus adsorption by plaque assay. Daidzein displayed low activity against DENV-2, and hesperetin was not effective against DENV-2. Additionally, the presence of $50 \mu\text{g/mL}$ of quercetin reduced DENV-2 RNA production levels by 67% compared to the control [48]. Naringenin and quercetin flavonoids have also shown antiviral activity against DENV-1 to 4 and MAYV, respectively [51,52]. In another study, the authors screened methanolic extracts of medicinal plants for their anti-DENV activity. The species *A. paniculata* and *Momordica charantia* inhibited DENV replication by 75 and 50%, respectively. The authors attributed the antiviral action to the flavonoids kaempferol, quercetin (found in *M. charantia*), and luteolin [53].

In our study, two of these flavonoids were identified by HPLC: naringin in the CAH21 extract and quercetin in the CAH24 extract. Syringic acid identified in CAH24 has not previously been correlated with antiviral activities against arboviruses, and there are limited studies on the antiviral activity of chlorogenic acid [58]. However, it has been suggested that the antiviral activity (against herpes simplex virus, HSV) of substances isolated from *Persea americana* may be due to a synergism between flavonoids and chlorogenic acid [56].

The flavonoids' antiviral activity has been linked to the inhibition of viral RNA polymerase, as well as the prevention of viral adhesion and entry into cells [43,46,59]. The affinity between the constituents present in the extract and specific viral proteins largely depends on the types of chemical bonds formed between these substances and the

amino acids of the viral proteins. The separation of nonpolar and polar components from plant extracts may increase the likelihood of discovering highly active antiviral compounds with low cytotoxicity [39]. Therefore, elucidating the antiviral mechanism of *C. alba* extracts necessitates the identification of their biologically active constituents, which would allow the active principle to be used without interference from other metabolites. The potential antiviral activity found in the *C. alba* extracts can likely be attributed to the presence of major components, such as flavonoids.

In this study, we conducted an *in silico* analysis of the potential binding of the metabolites identified in the *C. alba* extracts with the nsP2 protease of CHIKV and MAYV. Given their antiviral activity, the flavonoid molecules detected in both extracts were analyzed for their interactions with the nsP2 proteins of CHIKV and MAYV. Beyond its protease activity, nsP2 also exhibits other enzymatic functions during viral replication, such as RNA helicase and RNA triphosphatase activities, which are responsible for unwinding duplex RNA and removing the phosphate-5' group from viral RNA during the capping reaction [7]. Molecular docking analysis revealed that the most common type of interactions in the active sites of nsP2 for both CHIKV and MAYV were van der Waals interactions. Although the van der Waals interactions are generally considered weak, their prevalence suggests a good correlation between the protein binding site and the ligand structure, potentially leading to effective antiviral activity [60,61].

The high-resolution crystal structure of CHIKV nsP2 facilitates the search for antiviral molecules. To construct the crystal structure of MAYV nsP2, the Ramachandran plot is a critical quality assessment tool for selecting experimental structure models. The Ramachandran values indicate the distribution of protein torsion angles (ϕ , Ψ), with an ideal reference parameter close to 96% [28,61,62].

Recently, the flavanone glycoside naringin was identified as binding to nsP2 protease with nanomolar affinity through a combination of receptor-based docking and molecular dynamics (MD) simulations. The protease–naringin complex was subjected to MD simulations to test the stability of the protein–ligand complex. Using the ParDOCK server, it was found that naringin had a strong affinity for the nsP2 active site, with an affinity energy of -9.47 kcal/mol, supporting our findings [62]. Additionally, an *in silico* study examining the possible molecular interactions between CHIKV nsP3 and three potential flavonoid ligands was conducted. Among these, the flavonoid baicalin showed

the highest binding affinity (-9.8 kcal/mol), suggesting it could be a potent CHIKV nsP3 inhibitor [60].

To our knowledge, this is the first study demonstrating the *in silico* interaction between flavonoids and MAYV nsP2 protease. However, the antiviral activity of the flavonoid epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* against the MAYV capsid protein (protein C) was identified previously [42]. Additionally, the anti-MAYV and anti-CHIKV activities of the flavonoid silymarin have been confirmed through *in vitro* biological assays [63,64].

Natural products, whether in their native form or after extraction of their active ingredients, have long been used by different populations. The use of plants in traditional Brazilian medicine to treat various diseases is increasing, due to the diversity of the bioactive constituents they contain, making them potential sources of antiviral substances [10,11,12,13,14]. Traditional ethnopharmacology has enabled, through isolation and characterization methods and the development of specific chemoinformatics methods, the discovery of many modern drugs, such as aspirin, atropine, ephedrine, digoxin, morphine, quinine, reserpine, and tubocurarine. These are some examples of the drugs that were originally discovered through the study of the traditional cures and popular knowledge of indigenous peoples [65]. The knowledge of ethnopharmacology, supported by its experience-based holistic and systemic approach, can serve as an innovative and powerful discovery mechanism for newer, safer, and more accessible drugs [66]. In this context, the prospect of discovering new plant-derived drugs remains highly relevant and is supported by numerous publications demonstrating the antiviral activity of plant derivatives [10], their broad structural diversity, and their extensive availability in nature [11].

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Plant Material

C. alba roots were collected in March 2019 in Formoso do Araguaia ($11^{\circ}47'48''$ S latitude, $49^{\circ}31'44''$ W longitude), Tocantins state, Brazil [24]. The plant was identified at the herbarium of the Department of Environmental Studies at the Federal University of Tocantins (Campus Porto Nacional), where a specimen voucher was deposited under the code HTO-11.160. The research was authorized by the Sistema Nacional de Gestão do

Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) under the number A77A809.

2.4.2 Preparation of Extracts

The plant material powder was subjected to two different extraction processes: maceration (CAH21) and Soxhlet extraction (CAH24), using a Marconi, model MA-487/6/25, (São Paulo, Brazil). For the CAH21 process, powdered roots (500 g) were extracted at room temperature (25 °C) for three days with methanol (MeOH). For the CAH24 process, powdered roots (500 g) were extracted at 60 °C for 4 h with MeOH. The samples were filtered through Whatman No. 1 filter paper (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA), and the liquid fractions were concentrated using a rotary evaporator to obtain crude extracts [24,67]. Each methanol extract was lyophilized and stored in a moisture-free desiccator until use. Stock solutions were prepared at a concentration of 10,000 µg/mL, using only Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Cultilab, São Paulo, Brazil), with no organic solvents used to solubilize the extracts. Before the assays, the fractions were filtered using a Durapore® membrane filter, 0.22 µm.

2.4.3 Chemical Analysis of Extracts

The chemical profiles of the *C. alba* root extracts (CAH21 and CAH24) were analyzed in triplicate using a gas chromatograph (Shimadzu, model QP2020, Tokyo, Japan) coupled to a mass spectrometer (GC-MS) at the Analytical Center of the Institute of Chemistry of the University of São Paulo (IQUSP). Separation of the target analytes was achieved on a DB-1 capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). The analysis conditions were as follows: Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 2.5 mL/min; the temperature program ranged from 50 °C to 280 °C at a rate of 60 °C/min; the injector and interface temperatures were maintained at 280 °C; and the mass spectrometer operated with an electron impact ionization of 70 eV and swept from 50 to 700 µs. Compounds were identified by comparing their spectra with the National Institute of Standards and Technology (NIST) database. The structures of the components in the test materials were identified based on their molecular weights.

The partial chemical profiles of the *C. alba* extracts (CAH21 and CAH24) were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) at the Scientific Instrumentation Laboratory (LABIC) of the Federal University of Tocantins. The analysis was conducted using a SHIMADZU® HPLC system (Kyoto, Japan) consisting of a LC-

10ATVp pump, CTO-10A column oven, DGU14A degasser, SCL 10A system controller, and Shimadzu SPD-10AT UV-VIS detector, with a loop injector with a 20 μ L loop size.

Chromatographic analysis was performed under gradient conditions using a C-18 reverse-phase column (250 $\times$ 4.6 mm, particle size 5 μ m, Luna 5 μ C-18). The elution solvents were 0.1% phosphoric acid in water (solvent A) and 0.1% phosphoric acid in water/acetonitrile/methanol (54:35:11 v/v) (solvent B) (Table S2). The flow rate was set at 1.0 mL/min, with a detection wavelength was 280 nm. The compounds were identified by comparing sample retention times with those of the 16 available authentic standards (Figure S7) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.4.4 Cells and Viruses

Vero cells (ATCC[®]: CCL81)—derived from African green monkey kidney (*Cercopithecus aethiops*)—were obtained from the Feevale University Molecular Microbiology stock (Rio Grande do Sul, Brazil). These cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, São Paulo, Brazil), and maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

The viral isolates used in the experiments were a CHIKV isolate from the East/Central/South African genotype (GenBank accession no. LR2006_OPY1) and the MAYV BeAr 20290 (GenBank accession no. KT754168). The Vero cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) = 0.01, in a 75 cm² culture flask containing a monolayer of 8.5 $\times$ 10⁶ cells. The infected cells were incubated for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. The supernatant was collected and stored at –80 °C until viral titration [67,68].

2.4.5 Viral Titration by Plaque Assay

The Vero cells were plated in 12- and 24-well plates 24 h before conducting the assay. A semi-solid medium was prepared with 2X minimum essential medium (MEM) (Cultilab, São Paulo, Brazil), and carboxymethylcellulose sodium salt (CMC) high viscosity (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 1.5% for CHIKV and 1% for the MAYV titration. The culture medium in the plates was removed by aspiration, and virus inoculum of various concentrations were added to duplicate wells. The inoculum fluid was distributed by gently rocking the plates manually. The plates were then incubated at 37 °C for about 1 h, rocking every 15 to 20 min. After incubation, the plates were incubated for 5 days. For cell fixation, 4% formaldehyde was added for 30 min, and the

wells were washed with 1X phosphate-buffered saline (PBS, 137.0 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.0 mM Na₂HPO₄, 2.0 mM KH₂PO₄, pH 7.4) [63,68]. The plates were then stained with 0.2% crystal violet (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 30 min. After staining, the crystal violet was removed, and the plaques were counted 24 h later. The viral titer was calculated in plaque-forming units (PFU/mL).

2.4.6 Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of the plant extracts (CAH21 and CAH24) was assessed using the standardized neutral red incorporation assay for lysosomal viability at the Department of Cell Biology, University of Brasília [69]. For this assay, 96-well plate microplates were prepared 24 h in advance, with Vero cells at a concentration of 1×10^5 cells per well. After removing the medium, 150 µL of each extract's serial dilution (starting at 5 mg/mL) was added in triplicate. Untreated cells served as controls, with an equal volume (150 µL) of DMEM added.

The plates were incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 48 h. Cell viability was determined by comparing the absorbance values obtained for each concentration with those obtained for the control cells (considered 100% viable). The extract concentration toxic to 50% (CC₅₀) and 90% (CC₉₀) of the cells was calculated using the dose–response curve. The experiment was performed in triplicate with three independent replications.

2.4.7 Antiviral Assays

For the antiviral activity tests, microplates were prepared as previously described. After incubation at 37 °C in a humidified environment with 5% CO₂, the viral suspension (MOI = 0.01) was inoculated. DMEM was added to the wells designated for cell control and cytotoxicity control. After 1 h of incubation with gentle shaking every 15 min, the respective viral suspensions and medium were aspirated from all the wells, which were then washed with 1X PBS. Different concentrations of plant extracts (40, 60, 80, and 100 µg/mL) were prepared with the semi-solid medium and added to the respective treatment wells. The cytotoxicity control wells received the highest concentration of the extracts (100 µg/mL). The microplates were incubated at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere for 48 h.

Subsequently, the wells were fixed and stained as previously described. The analysis was conducted in duplicate, with at least three independent experiments performed, following the standardized protocol for each virus. The percentage reduction

in the number of plaques was calculated using the formula $A (\%) = 100 - [(B \times 100)/C]$, where A is the percentage reduction in the plaque number, B is the average number of plaques for the treatments, and C is the number of plaques in the viral control [70]. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated, and the selectivity index (SI) was determined using the ratio CC_{50}/IC_{50} .

2.4.8 *In silico* Analysis of the Interaction between Molecules of *C. alba* and the nsP2

Protease of CHIKV and MAYV

The amino acid sequence of the MAYV nsP2 protease, available at GenBank ID: AZM66145.1, was used to construct the 3D structure through homology modeling using the Swiss Model Workspace platform (<https://swissmodel.expasy.org/> (accessed on 4 December 2019)). This was achieved using the homologous protein nsP2 of CHIKV, available in the Protein Data Base (PDB) ID: 4ZTB. Additionally, the 3D structure file of the CHIKV nsP2 protease is available in the PDB under ID: 3TRK.

Flavonoids and phenolic acids from *C. alba* (naringin, syringic and chlorogenic acids, vitexin, myricetin, and quercetin) were modeled using Marvin Sketch 18.10 (ChemAxon, Budapest, Hungary). Molecular docking of the receptors and ligands was performed using AutoDock Tools 1.5.7 [71], following the methodology proposed by our colleagues [72]. Docking calculations were executed with AutoDock Vina, generating nine docking positions for each ligand by interacting with the target proteins and providing affinity energy values (Kcal/mol). The docking results were analyzed using PyMOL 2.0 [73] and Discovery Studio 4.5 [74] to identify the best binding location for each ligand within the protein target.

2.4.9 *Statistical Analysis*

All the data were graphed using GraphPad Prism[®] software (version 8.0.1, San Diego, CA, USA). Statistical significance was determined by ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, except for the cell viability studies, which utilized nonlinear regression curve fit analysis. The toxic concentration for the cells was determined from the linear equation. For all analyses, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

2.5 Conclusions

The methanolic extracts of *C. alba* roots demonstrated potential activity against CHIKV and MAYV. In *in silico* analysis, they revealed that the flavonoids naringin and vitexin exhibited high binding affinity with the nsP2 protease enzymes of CHIKV and MAYV. Consequently, it is hypothesized that these bioligands may inhibit viral replication. To confirm this potential inhibition, additional studies on enzymatic activity are required, in addition to fractionation of the crude extract by guided bioassay, to isolate the antiviral molecule. Further studies with the aerial parts of the plant will be important to search for antiviral molecules that can maintain the preservation of the species in phytochemical screening research. Therefore, *C. alba* extracts represent a possible source of antiviral compounds for the development of drugs against viral infections that affect millions of people worldwide.

Supplementary Materials: The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms252111397/s1>.

2.6 References

1. Cleton, N.; Koopmans, M.; Reimerink, J.; Godeke, G.J.; Reusken, C. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *J. Clin. Virol.* **2012**, *55*, 191–203. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Pereira, T.N.; Carvalho, F.D.; De Mendonça, S.F.; Rocha, M.N.; Moreira, L.A. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0007518. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Contigiani, M.S.; Diaz, L.A. Togaviridae. In *Arthropod Borne Diseases*; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 115–135. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Pego, P.N.; Gomes, L.P.; Provance, D.W., Jr.; De-Simone, S.G. Mayaro virus Disease. *J. Hum. Virol. Retrovirol.* **2014**, *1*, 00018. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Kielian, M.; Chanel-Vos, C.; Liao, M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses* **2010**, *2*, 796–825. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Carey, B.D.; Bakovic, A.; Callahan, V.; Narayanan, A.; Kehn-Hall, K. New World *Alphavirus* protein interactomes from a therapeutic perspective. *Antivir. Res.* **2019**, *163*, 125–139. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

7. Nguyen, P.T.; Yu, H.; Keller, P.A. Identification of Chikungunya virus nsP2 protease inhibitors using structure-base approaches. *J. Mol. Graph. Model.* **2015**, *57*, 1–8. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Abu Bakar, F.; Ng, L.F.P. Nonstructural Proteins of *Alphavirus*-Potential Targets for Drug Development. *Viruses* **2018**, *10*, 71. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
9. Rashad, A.A.; Mahalingam, S.; Keller, P.A. *Chikungunya virus*: Emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1147–1166. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lin, L.T.; Hsu, W.C.; Lin, C.C. Antiviral natural products and herbal medicines. *J. Tradit. Complement. Med.* **2014**, *4*, 24–35. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
11. Sharma, P.; Manchanda, R.; Goswami, R.; Chawla, S. Biodiversity and therapeutic potential of medicinal plants. In *Environmental Concerns and Sustainable Development: Volume 2: Biodiversity, Soil and Waste Management*; Springer: Singapore, 2020; pp. 27–44. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
12. Akram, M.; Tahir, I.M.; Shah, S.M.A.; Mahmood, Z.; Altaf, A.; Ahmad, K.; Munir, N.; Daniyal, M.; Nasir, S.; Mehboob, H. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. *Phytother. Res.* **2018**, *32*, 811–822. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Zaynab, M.; Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M.H.; Bahadar, K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 198–202. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Zakaryan, H.; Arabyan, E.; Oo, A.; Zandi, K. Flavonoids: Promising natural compounds against viral infections. *Arch. Virol.* **2017**, *162*, 2539–2551. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Aro, A.O.; Dzoyem, J.P.; Goddard, A.; Fonteh, P.; Kayoka-Kabongo, P.N.; McGaw, L.J. *In vitro* Antimycobacterial, Apoptosis-Inducing Potential, and Immunomodulatory Activity of Some Rubiaceae Species. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 185. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
16. Rivero-Cruz, I.; Cristians, S.; Ovalle-Magallanes, B.; Mata, R. Mexican copalchis of the Rubiaceae family: More than a century of pharmacological and chemical investigations. *Phytochem. Rev.* **2019**, *18*, 1435–1455. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
17. Martins, D.; Nunez, C.V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* **2015**, *20*, 13422–13495. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Gazda, V.E.; Gomes-Carneiro, M.R.; Barbi, N.S.; Paumgartten, F.J. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *105*, 187–195. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
19. Bhattacharyya, J.; Cunha, E.V. A triterpenoid from the root-bark of *Chiococca alba*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2546–2547. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

20. Comerford, S.C. Medicinal plants of two mayan healers from San Andrés, Petén, Guatemala. *Econ. Bot.* **1996**, *50*, 327–336. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
21. Rico-Gray, V.; Chemás, A.; Mandujano, S. Uses of tropical deciduous forest species by the Yucatecan Maya. *Agrofor. Syst.* **1991**, *14*, 149–161. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
22. Hernández-Bolio, G.I.; Ruiz-Vargas, J.A.; Peña-Rodríguez, L.M. Natural Products from the Yucatecan Flora: Structural Diversity and Biological Activity. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 647–656. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
23. Borges, R.M.; Valença, S.S.; Lopes, A.A.; dos Santos Barbi, N.; da Silva, A.J.R. Saponins from the roots of *Chiococca alba* and their *in vitro* anti-inflammatory activity. *Phytochem. Lett.* **2013**, *6*, 96–100. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
24. Borges, J.C.M.; Haddi, K.; Valbon, W.R.; Costa, L.T.M.; Ascêncio, S.D.; Santos, G.R.; Soares, I.M.; Barbosa, R.S.; Viana, K.F.; Silva, E.A.P.; et al. Methanolic Extracts of *Chiococca alba* in *Aedes aegypti* Biorational Management: Larvicidal and Repellent Potential, and Selectivity against Non-Target Organisms. *Plants* **2022**, *11*, 3298. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
25. Sanner, M.F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 57–61. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
26. Hobohm, U.; Sander, C. A sequence property approach to searching protein databases. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 390–399. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Moura, W.S.; de Souza, S.R.; Campos, F.S.; Cangussu, A.S.R.; Santos, E.M.S.; Andrade, B.S.; Gomes, C.H.B.; Viana, K.F.; Haddi, K.; Oliveira, E.E.; et al. Antibacterial activity of *Siparuna guianensis* essential oil mediated by impairment of membrane permeability and replication of pathogenic bacteria. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *146*, 112–142. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
28. Sobolev, O.V.; Afonine, P.V.; Moriarty, N.W.; Hekkelman, M.L.; Joosten, R.P.; Perrakis, A.; Adams, P.D. A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry. *Structure* **2020**, *28*, 1249–1258.e2. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
29. Zou, J.; Yin, J.; Fang, L.; Yang, M.; Wang, T.; Wu, W.; Bellucci, M.A.; Zhang, P. Computational Prediction of Mutational Effects on SARS-CoV-2 Binding by Relative Free Energy Calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 5794–5802. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
30. Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Sensch, K.H.; Reichling, J. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytother. Res.* **2009**, *24*, S20–S28. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

31. De Castro, M.L.; García-Ayuso, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *369*, 1–10. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
32. Onwubuya, E.I.; Oladejo, A.A. Cardio-Protective Effect of the Leaf Extract of *Andrographis paniculata* in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction. *Cardiol. E Angiol. Um Periódico Int.* **2022**, *11*, 467–478. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
33. Sarumathy, K.; Rajan, M.D.; Vijay, T.; Jayakanthi, J. Evaluation of phytoconstituents, nephro-protective and antioxidant activities of *Clitoria ternatea*. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011**, *1*, 164–172. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
34. Novak, J.; Novak, S.; Bitsch, C.; Franz, C.M. Essential oil composition of underground parts of *Valeriana celtica* ssp. from Austria and Italy. *Flavour Fragr. J.* **2000**, *15*, 40–42. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
35. Sati, S.; Mathela, C.S. Volatile Constituents in the Root and Leaf Oils of *Valeriana pyrolaefolia* Decne. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18*, 29–31. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
36. Gu, H.; Foong, S.Y.; Lam, S.S.; Yue, X.; Yang, J.; Peng, W. Characterization and potential utilization of extracts and pyrolyzates from *Jasminum nudiflorum* Lindl. Bark. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2021**, *155*, 105092. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
37. Cao, G.; Zhang, Y.; Feng, J.; Cai, H.; Zhang, C.; Ding, M.; Cong, X.; Cai, B. A rapid and sensitive assay for determining the main components in processed fructus Corni by UPLC–Q-TOF-MS. *Chromatographia* **2011**, *73*, 135–141. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
38. Zou, H.; Wu, T.; Wang, Y.; Kang, Y.; Shan, Q.; Xu, L.; Jiang, Z.; Lin, X.; Ye, X.Y.; Xie, T.; et al. 5-Hydroxymethylfurfural enhances the antiviral immune response in macrophages through the modulation of RIG-I-mediated interferon production and the JAK/STAT signaling pathway. *ACS Omega* **2021**, *6*, 28019–28030. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
39. Sriphana, U.; Yenjai, C.; Tungnoi, S.; Srirapa, J.; Junsongduang, A. Flavonoids from *Milletia leucantha* and Their Cytotoxicity. *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 961–962. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
40. Solnier, J.; Fladerer, J.P. Flavonoids: A complementary approach to conventional therapy of COVID-19? *Phytochem. Rev.* **2020**, *20*, 773–795. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
41. Arthanari, S.K.; Vanitha, J.; Ganesh, M.; Venkateshwaran, K.; Clercq, D. Evaluation of antiviral and cytotoxic activities of methanolic extract of *S. grandiflora* (Fabaceae) flowers. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2012**, *2*, S855–S858. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Ferreira, P.G.; Ferraz, A.C.; Figueiredo, J.E.; Lima, C.F.; Rodrigues, V.G.; Taranto, A.G.; Ferreira, J.M.S.; Brandão, G.C.; Vieira-Filho, S.A.; Duarte, L.P.; 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. *Arch. Virol.* **2018**, *163*, 1567–1576. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

43. Ninfali, P.; Antonelli, A.; Magnani, M.; Scarpa, E.S. Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies. *Nutrients* **2020**, *12*, 2534. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
44. Goh, V.S.L.; Mok, C.K.; Chu, J.J.H. Antiviral natural products for arbovirus infections. *Molecules* **2020**, *25*, 2796. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jayadevappa, M.K.; Karkera, P.R.; Siddappa, R.Y.; Telkar, S.; Karunakara, P. Investigation of plant flavonoids as potential dengue protease inhibitors. *J. Herbmед Pharmacol.* **2020**, *9*, 366–373. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
46. Oliveira, A.F.C.D.S.; Teixeira, R.R.; Oliveira, A.S.D.; Souza, A.P.M.D.; Silva, M.L.D.; Paula, S.O.D. Potential antivirals: Natural products targeting replication enzymes of dengue and chikungunya viruses. *Molecules* **2017**, *22*, 505. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ahmadi, A.; Hassandarvish, P.; Lani, R.; Yadollahi, P.; Jokar, A.; Bakar, S.A.; Zandi, K. Inhibition of *Chikungunya virus* replication by hesperetin and naringenin. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 69421–69430. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Zandi, K.; Teoh, B.T.; Sam, S.S.; Wong, P.F.; Mustafa, M.R.; Abu Bakar, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virol. J.* **2011**, *8*, 560. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Sanchéz, I.; Gómez-Garibay, F.; Taboada, J.; Ruiz, B.H. Antiviral effect of flavonoids on the *dengue virus*. *Phytother. Res. Int. J. Devoted Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.* **2000**, *14*, 89–92. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
50. Grienke, U.; Richter, M.; Walther, E.; Hoffmann, A.; Kirchmair, J.; Makarov, V.; Nietzsche, S.; Schmidtke, M.; Rollinger, J.M. Discovery of prenylated flavonoids with dual activity against *Influenza virus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 27156. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Frabasile, S.; Koishi, A.C.; Kuczera, D.; Silveira, G.F.; Verri, W.A., Jr.; Dos Santos, C.N.D.; Bordignon, J. The citrus flavanone naringenin impairs *dengue virus* replication in human cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41864. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
52. dos Santos, A.E.; Kuster, R.M.; Yamamoto, K.A.; Salles, T.S.; Campos, R.; de Meneses, M.D.; Soares, M.R.; Ferreira, D. Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 41864. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
53. Tang, L.I.; Ling, A.P.; Koh, R.Y.; Chye, S.M.; Voon, K.G. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 3. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Lalani, S.; Poh, C.L. Flavonoids as antivirals agents for *Enterovirus A71* (EV-A71). *Viruses* **2020**, *12*, 184. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Chen, S.G.; Leu, Y.L.; Cheng, M.L.; Ting, S.C.; Liu, C.C.; Wang, S.D.; Yang, C.H.; Hung, C.Y.; Sakurai, H.; Chen, K.H.; et al. Anti-enterovirus 71 activities of *Melissa officinalis* extract and its biologically active constituent rosmarinic acid. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12264. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Shimizu, J.F.; Lima, C.S.; Pereira, C.M.; Bittar, C.; Batista, M.N.; Nazaré, A.C. Flavonoids from *Pterogyne nitens* inhibit hepatitis C virus entry. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16127. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Calland, N.; Albecka, A.; Belouzard, S.; Wychowski, C.; Duverlie, G.; Descamps, V.; Hober, D.; Dubuisson, J.; Rouillé, Y.; Séron, K. (–)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. *Hepatology* **2012**, *55*, 720–729. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
58. Miao, M.; Xiang, L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. *Adv. Pharmacol.* **2020**, *87*, 71–88. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
59. Bissoyi, A.; Pattanayak, S.K.; Bit, A.; Patel, A.; Singh, A.K.; Behera, S.S.; Satpathy, D. *Alphavirus* nonstructural proteases and their inhibitors. In *Viral Proteases and Their Inhibitors*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 77–104. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Seyedi, S.S.; Shukri, M.; Hassandarvish, P.; Oo, A.; Shankar, E.M.; Abubakar, S.; Zandi, K. Computational approach towards exploring potential anti-chikungunya activity of selected flavonoids. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24027. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Narwal, M.; Singh, H.; Pratap, S.; Malik, A.; Kuhn, R.J.; Kumar, P.; Tomar, S. Crystal structure of *Chikungunya virus* nsP2 cysteine protease reveals a putative flexible loop blocking its active site. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *116*, 451–462. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Tripathi, P.K.; Singh, J.; Gaurav, N.; Garg, D.K.; Patel, A.K. In-silico and biophysical investigation of biomolecular interaction between naringin and nsP2 of the *Chikungunya virus*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *160*, 1061–1065. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
63. Camini, F.C.; da Silva, T.F.; da Silva Caetano, C.C.; Almeida, L.T.; Ferraz, A.C.; Vitoreti, V.M.A.; de Mello Silva, B.; de Queiroz Silva, S.; de Magalhães, J.C.; de Brito Magalhães, C.L. Antiviral activity of silymarin against *Mayaro virus* and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antivir. Res.* **2018**, *158*, 8–12. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
64. Lani, R.; Hassandarvish, P.; Chiam, C.W.; Moghaddam, E.; Chu, J.J.H.; Rausalu, K.; Merits, A.; Higgs, S.; Vanlandingham, D.; Abu Bakar, S.; et al. Antiviral activity of silymarin against *chikungunya virus*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11421. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Gilani, A.H. Trends in ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 43–49. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Pirintsos, S.; Panagiotopoulos, A.; Bariotakis, M.; Daskalakis, V.; Lionis, C.; Sourvinos, G.; Karakasiliotis, I.; Kampa, M.; Castanas, E. From traditional ethnopharmacology to modern natural drug discovery: A methodology discussion and specific examples. *Molecules* **2022**, *27*, 4060. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Chiamenti, L.; Silva, F.P.D.; Schallemberger, K.; Demoliner, M.; Rigotto, C.; Fleck, J.D. Cytotoxicity and antiviral activity evaluation of *Cymbopogon* spp hydroethanolic extracts. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2019**, *55*, e18063. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
68. Troian, E.A.; Schallenger, K.; Da Silva, F.P.; Dietrich, G.K.; Ferreira Chiesa, F.; Olivaro, C.; Wallace, F.; Fleck, J.; Verza, S. Screening for antiviral activity of two purified saponin fractions of *Quillaja* spp. against *Yellow fever virus* and *Chikungunya virus*. *Int. J. Innov. Educ. Res.* **2020**, *8*, 205–214. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
69. Repetto, G.; Del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
70. Burleson, F.G.; Chambers, T.M.; Wiedbrauk, D.L. Techniques for evaluating antiviral agents. In *Virology: A Laboratory Manual*; Burleson, F.G., Ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 1994. [[Google Scholar](#)]
71. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
72. Borges, J.C.M.; Haddi, K.; Oliveira, E.E.; Andrade, B.S.; Nascimento, V.L.; Melo, T.S.; Didonet, J.; Carvalho, J.C.T.; Cangussu, A.S.; Soares, I.M.; et al. Mosquitocidal and repellent potential of formulations containing wood residue extracts of a Neotropical plant, *Tabebuia heptaphylla*. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *129*, 424–433. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
73. Schrodinger LLC. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.2.2*; Schrodinger LLC: New York, NY, USA, 2018. [[Google Scholar](#)]
74. Dassault Systems BIOVIA. *Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017*; Dassault Systems: San Diego, CA, USA, 2017. [[Google Scholar](#)]

3 CAPÍTULO 2: TRIAGEM *IN VITRO* DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO RICOS EM POLIFENÓIS FRENTE AO VÍRUS CHIKUNGUNYA

3.1 INTRODUÇÃO

As arboviroses têm afetado a população e preocupado gestores públicos nas regiões neotropicais, devido aos surtos e epidemias enfrentadas no Brasil e no mundo. São doenças transmitidas por vetores restritos a artrópodes hematófagos, especialmente mosquitos do gênero *Aedes* (Culicidae). As principais arboviroses transmitidas por esses vetores incluem dengue, febre amarela, febre do chikungunya e zika. Adicionalmente, estudos confirmam que esses vetores também são capazes de transmitir outras arboviroses, como a febre mayaro e a febre oropouche (Honório et al. 2018; Jain et al. 2020; Mendonça et al. 2021).

A propagação dessas doenças pode ser considerada uma consequência de mudanças ambientais, urbanização acelerada, deficiências na saúde pública e problemas na coleta de lixo. No Brasil, não há medicamentos específicos ou vacinas licenciadas disponíveis para a infecção causada pelo vírus chikungunya (CHIKV), e pessoas infectadas podem sofrer com artralgia por anos (Amaral et al. 2020). As estratégias de prevenção e controle da doença são focadas nos vetores e incluem o uso de inseticidas, manejo ambiental e mobilização social, embora, na prática, tenham se mostrado pouco eficazes. É sabido que estratégias combinadas apresentam melhores resultados, mas não solucionam totalmente o problema (Girad et al. 2020; de Góes Cavalcanti et al. 2022).

Produtos naturais com propriedades terapêuticas têm sido utilizados pela população há aproximadamente 5.000 anos, mas foi somente a partir do século XIX que ocorreu a transição de plantas medicinais para produtos farmacêuticos (Suntar, 2020). A extração, purificação e caracterização dos derivados vegetais ainda representam um grande desafio no processo de descoberta de fármacos. Contudo, os avanços no campo da fitoquímica permitiram obter compostos puros, resultando em medicamentos com dosagens muito mais seguras e eficazes (Brusotti et al. 2014).

Nesse contexto, diversos estudos – *in vitro*, *in vivo* e *in silico* com plantas medicinais ricas em polifenóis têm sido realizados, possibilitando estratégias eficazes para o tratamento ou prevenção de várias infecções causadas por diferentes arbovírus que afetam humanos (Ninfali et al. 2020; Lin et al. 2021; Chojnacka et al. 2021; Abookleesh et al 2022). Evidências científicas mostram que o fracionamento por ensaio bio-guiado

apresenta vantagens na descoberta de novos medicamentos naturais, devido ao sinergismo entre os compostos, à concentração otimizada de fitocompostos específicos e à sua capacidade de atingir concentrações farmacológicas relevantes dentro de uma janela terapêutica segura.

3.2 OBJETIVO

Através do método de ensaio bio-guiado, avaliar o potencial anti-CHIKV *in vitro* de extratos vegetais do Cerrado ricos em polifenóis – *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC, *Erythroxylum suberosum*, *Sapindus saponaria* L., *Morus nigra* Linné, e *Miconia chamissois* Naudin.

3.2.1 Objetivos específicos

- Determinar a citotoxicidade dos extratos vegetais, das frações, subfrações e da molécula isolada;
- Avaliar o potencial antiviral dos extratos vegetais através de diferentes estratégias de inibição do ciclo de replicação do CHIKV;
- Através de ensaio bio-guiado, realizar o fracionamento do extrato e testar as frações, subfrações e da(s) molécula(s) quanto a sua atividade anti-CHIKV;
- Purificar e caracterizar a(s) molécula(s) com atividade anti-CHIKV;
- Discutir quais são os possíveis mecanismos de ação da(s) molécula(s) isolada(s).

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Extratos vegetais

Uma triagem prévia de extratos de plantas do Cerrado ricos em polifenóis, foi realizada pelos alunos do departamento de Farmácia, sob coordenação da Prof.^a Dr.^a Pérola Magalhães, da Universidade de Brasília, Brasil. De acordo com os perfis fitoquímicos já estudados, cinco extratos vegetais foram selecionados e gentilmente cedidos para realização do presente trabalho: *Sapindus saponaria* L. (Rashed et al. 2013; Gasca et al. 2020), *Morus nigra* Linné (de Freitas et al. 2016), *Miconia chamissois* Naudin (Gomes, 2021), *Erythroxylum suberosum* (Leite et al. 2014; Barros et al. 2016) e *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC (Silva, 2016) (Tabela 1). Os extratos foram submetidos a um estudo por ensaio bio-guiado, com objetivo de fracionar e isolar moléculas com atividade antiviral.

3.3.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na fase estacionária foram utilizadas placas analíticas de sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄S com 0,2 mm de espessura (Sigma-Aldrich) fixadas em suporte de alumínio. Uma alíquota de 10 µL de cada fração na concentração de 1 mg/mL foi aplicada na placa. As amostras concentradas, foram aplicadas com auxílio de um capilar a cerca de 1 cm da base inferior da placa para o ponto de aplicação e cerca de 1 cm entre elas. Para a detecção de compostos fenólicos, foi usado como fase móvel o eluente constituído por acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada, 100:11:11:26 (v/v/v/v). Os cromatogramas foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), no comprimento de onda de 365 nm. Posteriormente, a placa cromatográfica foi borrifada com o revelador de sulfato cérico preparado a partir de 2,1 g de Ce(SO₄)₂.5H₂O dissolvido em 15 mL de H₂SO₄ e concentrado em 800 mL de água. E em seguida, aqueceu-se a placa com ajuda de uma mesa aquecedora, até o surgimento das bandas (Chaves, 1997; Kagan & Flythe, 2014).

O revelador de sulfato cérico apresenta resposta positiva para flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas e alcaloides. Além disso, o íon cérico é um forte agente oxidante, que ao reagir com um ácido forte, como ácido sulfúrico (H₂SO₄) foi possível detectar a presença dos compostos nas amostras por meio da formação de manchas de cores roxa e marrom claro (Wagner, 1996).

3.3.3 Cromatografia em coluna (CC)

Utilizou-se a coluna cromatográfica Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) como fase estacionária e metanol como fase móvel. A coluna de vidro possui 2,3 cm de diâmetro e 49,5 cm de comprimento. Após empacotamento completo da coluna, a fase sólida ocupou um comprimento de 27,5 cm. Os extratos aquosos (5 g) foram solubilizados em metanol (7 mL), utilizando banho ultrassom por 20 minutos. Em seguida, o extrato solubilizado foi adicionado pela parte superior da coluna e imediatamente foi acrescentado metanol, visando manter um perfil de eluição homogêneo no sistema cromatográfico até completo esgotamento. As amostras foram coletadas periodicamente a cada 5 minutos, por um tempo total de 330 minutos, e concentradas em tubos de ensaio. Após a avaliação do efeito das frações separadas, a fração ativa foi isolada por cromatografia de fase reversa utilizando um cromatógrafo preparativo. As alíquotas eluídas da coluna foram detectados usando o fotômetro Buchi UV C-640 (210 nm), e o sistema foi controlado pelo software de cromatografia de controle Sepacore (C-620, Buchi, Flawil, Suíça).

3.3.4 Análise espectroscópica

As análises foram feitas no Instituto de Química da Universidade de Brasília. Os espectros de RMN de ^1H (600 MHz) e de ^{13}C (150 MHz) foram gerados no espectrômetro de 300 MHz (Varian Mercury Plus), utilizando sondas de detecção ATB e SW de 5 mm de diâmetro interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm e os solventes deuterados foram D_2O e MeOD_4 , com tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.3.5 Cultura de células

As células da linhagem Vero (ATCC[®]:CCL81) – provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), disponíveis no estoque do Laboratório de Baculovírus da Universidade de Brasília (UnB, Brasil), foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, BR) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco, BR), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma, BR) e mantidas em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO_2 (5%) (Thermo Scientific, 4131), de acordo com o recomendado pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (APABCAM). Para individualização da monocamada celular foi utilizada solução de tripsina-EDTA a 0,25%

(Gibco, BR) (Ammerman et al. 2008). As células Vero, foram utilizadas para multiplicação e titulação viral, bem como nos experimentos de citotoxicidade e de ensaio de placa de lise.

3.3.6 Vírus: Estoque e multiplicação viral

O isolado viral utilizado nos experimentos foi o genótipo East/Central/South African (ECSA) (GenBank accession nº. LR2006_OPY1). Para obtenção do estoque viral inoculou-se o vírus, com Multiplicidade de Infecção (MOI) = 0,01, em células Vero cultivadas em frasco de cultura de 75 cm² (Greiner, BR) com monocamada de 90% de confluência. Posteriormente a adição da suspensão viral, as culturas foram mantidas em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 1 h. Após esse período, adicionou-se meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de P/S, permanecendo em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) para a replicação viral. Os cultivos celulares foram acompanhados diariamente com auxílio de microscópio óptico invertido (ZEISS, Axiovert 100) até visualização de efeito citopático em aproximadamente 80% da monocamada celular. O período de incubação para CHIKV foi de 48 h, após esse tempo a suspensão viral foi aspirada e adicionada em uma nova garrafa de 75 cm² com 90% de confluência celular, e esse processo foi repetido por 3 vezes. Em seguida, o estoque viral da última passagem foi aliquoteado e mantido a -80 °C até a titulação viral (McAuley & Beasley, 2016).

3.3.7 Titulação viral por Ensaio de Placa de Lise

Após a multiplicação e produção do estoque viral, foi realizada a titulação por ensaio de placa de lise. Para isso, microplacas de 12 poços, foram preparadas com 24 h de antecedência, utilizando 3,5x10⁵ de células/poço. Transcorridas 24 h de incubação em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ diluições seriadas das suspensões virais foram adicionadas, em duplicata, nos respectivos poços com diluições de 10⁻² a 10⁻⁶, sendo utilizado apenas DMEM com 1% de P/S nos poços correspondentes ao controle celular.

Transcorrido 1 h de incubação em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂, com homogeneização a cada 15 min, as respectivas suspensões virais, e o meio de manutenção (no caso dos controles celulares), foram aspirados e então o meio semissólido, foi adicionado. Este meio semissólido foi preparado com 100 mL de água destilada e 3 g de carboximetilcelulose (CMC) de alta viscosidade (Sigma, BR). Após autoclavagem do meio semissólido, diluiu-se em uma proporção 1:1 ao meio MEM 2X

(Gibco, BR) suplementado com 2% de FBS (Gibco, BR), 1% de P/S (Sigma, BR) e 25 mM de sal de sódio do ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-2-etano sulfônico (HEPES) (Sigma, BR) (Cory et al. 1974).

As microplacas permaneceram em estufa a 37°C, até completar o período padronizado para formação de placas de lise. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com tampão fosfato salino 1 X (PBS, pH 7,4) e fixadas com formaldeído (Synth, BR) a 4% por 30 min, em temperatura ambiente. A seguir, a solução de formaldeído foi retirada, os poços lavados com PBS 1 X e adicionou-se a solução de cristal violeta a 0,2% (Synth, BR), permanecendo sob agitação durante 1 h. Em seguida, o cristal violeta 0,2% foi aspirado e as microplacas foram colocadas emborcadas para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, as placas de lise formadas foram contadas e o título viral foi calculado, cujos valores foram expressos em unidades formadoras de placas (PFU/mL) (Mendoza et al. 2020).

3.3.8 Ensaio de citotoxicidade por captação do vermelho neutro

A citotoxicidade dos derivados vegetais foi avaliada através da viabilidade lisossomal, empregando o ensaio de incorporação do vermelho neutro (VN), conforme descrito por Borenfreund & Puerner (1985). Para isso, microplacas de 96 poços foram preparadas com 24 h de antecedência, utilizando células Vero na concentração de 1×10^5 células/poço, com meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de P/S, e mantidas em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%).

Transcorridas 24 h de incubação, o meio foi aspirado e 150 µL das diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) de cada extrato foram adicionados, em triplicata. Células não tratadas foram utilizadas como controle celular, adicionando-se igual volume (150 µL) de meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de P/S, incubando-as a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%), durante 48 h.

Após o período de incubação, os meios dos tratamentos e controle celular foram aspirados, e a solução de VN (N4638, Sigma, BR) a 0,004% (40 µg/mL) diluído em meio DMEM, foi adicionado em todos os poços (200µL) e incubou-se por 3 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%). A seguir, o meio foi removido e as células lavadas com 200 µL de PBS 1 X, por 2 vezes, seguida de outra lavagem com solução fixadora (solução de 1% de CaCl₂ em 0,5% de formaldeído). Após descarte por inversão, foi adicionada solução de lise (ácido acético a 1% em etanol a 50%), para liberação e solubilização do corante

vermelho neutro. Então, a placa foi gentilmente agitada por 10 min, em mesa agitadora orbital (Criemaq, BR).

Posteriormente, o conteúdo dos respectivos poços foi homogeneizado e transferido para uma nova placa de 96 poços. Para o branco utilizou-se a solução de lise. A leitura foi realizada em um leitor de placas Multimodo GloMax[®] Explorer GM3500 com filtro de 560nm (Repetto et al. 2008). O software utilizado para leitura das absorbâncias foi o GloMax[®] Explorer System Software (Promega). O percentual de viabilidade foi determinado a partir dos valores das absorbâncias obtidas subtraindo o valor da média do branco. Posteriormente, através da análise de regressão, foram calculados os valores de CC₅₀ e CC₉₀ (concentração de cada extrato que reduziu em 50 ou 90% a viabilidade celular), considerando os resultados obtidos em duplicata com três repetições independentes.

3.3.9 Efeito dos extratos vegetais na replicação do vírus Chikungunya

Para avaliarmos a atividade antiviral em diferentes etapas de tratamento, utilizou-se o ensaio de placas de lise. Para todos esses ensaios, microplacas de 12 poços foram preparadas com 24 h de antecedência, utilizando $3,5 \times 10^5$ células/poço, e incubadas a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%).

- a) Etapa de pós-tratamento: Transcorridas 24 h de incubação, o meio de manutenção foi aspirado e adicionada a respectiva suspensão viral (MOI=0,01) ou somente o meio de manutenção, no caso dos controles celular e de citotoxicidade. As microplacas foram incubadas durante 1 h em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%), agitando gentilmente a cada 15 min. Durante esse processo, as concentrações previamente estabelecidas no ensaio de citotoxicidade, foram diluídas em meio semissólido obtendo uma concentração final de CMC igual a 1,5%. Transcorrido 1 h, os meios das microplacas (da suspensão viral e dos controles celular e de citotoxicidade) foram aspirados, e os extratos diluídos em meio semissólido foram adicionados nos tratamentos.
- b) Etapa de co-tratamento: Após 24 h de incubação, o meio de manutenção foi aspirado e adicionada a suspensão viral (MOI=0,01) diluído em meio contendo as concentrações de extratos previamente estabelecidas no ensaio de citotoxicidade. No controle de citotoxicidade, a maior concentração testada dos extratos foi utilizada, e no controle celular adicionou-se somente o meio de manutenção. Enquanto isso, preparou-se o meio semissólido obtendo uma concentração final

de CMC igual a 1,5%. Transcorrido 1 h, os meios das microplacas (da suspensão viral com os extratos, e dos controles celular e de citotoxicidade) foram aspirados e os poços foram lavados com PBS 1 X. Após lavagem, o meio semissólido foi adicionado em todos os poços.

- c) Etapa de pré-tratamento: Após a incubação das células por 24 h, o meio de manutenção foi aspirado e adicionou-se somente o meio de manutenção nos controles celular e viral, enquanto nos tratamentos e controle de citotoxicidade adicionou-se as concentrações de extratos previamente estabelecidas diluídas em meio DMEM com 1% de P/S. As placas foram colocadas em estufa a 37 ° C sob atmosfera de CO₂ (5%) por 1 h. Transcorrido 1 h, os poços foram lavados com PBS 1 X e adicionou-se a suspensão viral (MOI=0,01) nos tratamentos e controle viral e as microplacas foram novamente levadas à estufa de CO₂ (5%) a 37 ° C por 1 h. A seguir, os meios das microplacas (da suspensão viral com os extratos, e dos controles celular e de citotoxicidade) foram aspirados e os poços foram lavados com PBS 1 X. Após lavagem, o meio semissólido foi adicionado em todos os poços.

Por fim, as microplacas, submetidas a diferentes etapas de tratamento, foram mantidas em estufa a 37 ° C sob atmosfera de CO₂ (5%) até a visualização de placas de lise, aproximadamente 48 h. Após esse período, as células foram fixadas e coradas conforme descrito no item 3.3.7. Para todos os controles de citotoxicidade, a maior concentração testada dos extratos foi utilizada.

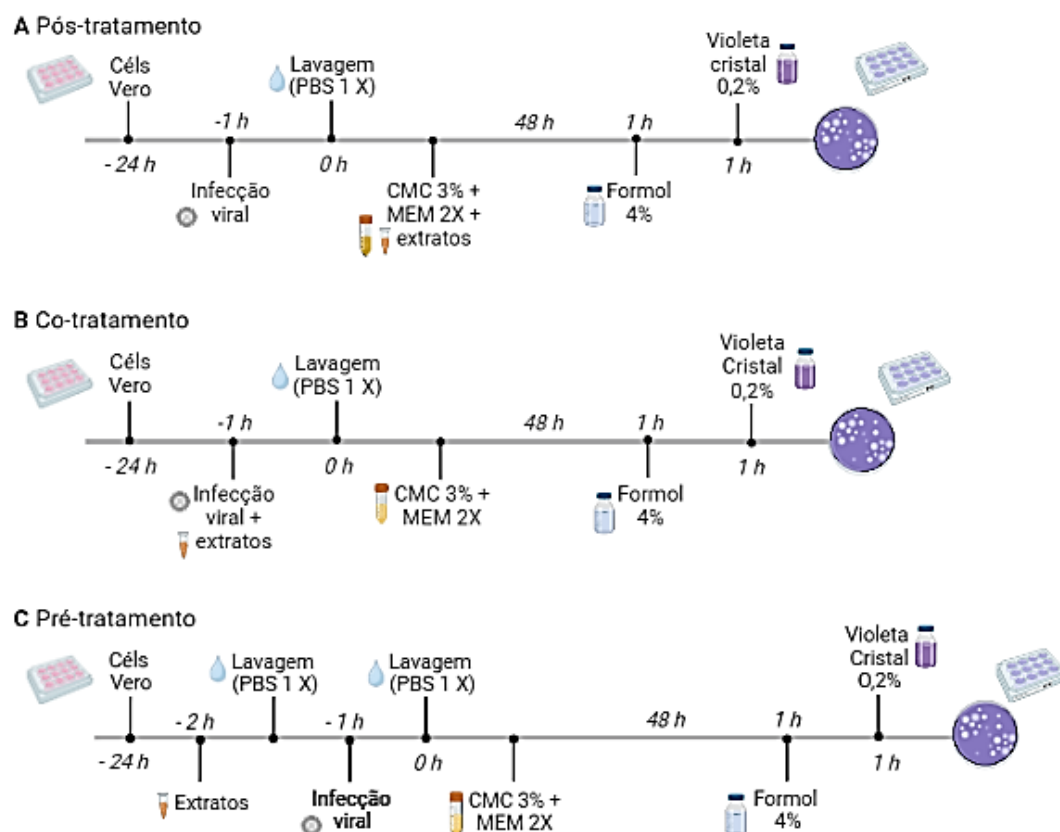


Figura 8. Fluxograma das etapas de tratamento para o ensaio antiviral dos extratos frente a CHIKV. Criado com BioRender.com

Foram considerados promissores os extratos que apresentaram percentual de redução do número de placas igual ou superior a 97%, e antiviral os extratos que apresentaram 99,99% de redução do número de placas. O percentual de redução do número de placas de lise em cada concentração de cada extrato avaliado, em relação aos controles virais, foi calculado conforme apresentado abaixo:

$$\% \text{ de redução viral} = 100 - \left(\frac{\text{média dos focos} \times 100}{\text{controle viral}} \right)$$

3.3.10 Microscopia eletrônica de transmissão

As células C6/36 de *Aedes albopictus* foram cultivadas em dois frascos de cultivo celular de 25cm³, em meio de TC-100 (Thermo Scientific 13055) suplementado com 10% de SFB e 1% P/S a 28°C. Um frasco foi infectado com CHIKV (GenBank nº. LR2006_OPY1) MOI=0,01 e o outro foi utilizado como controle celular. Após 1h de infecção, as células foram incubadas em estufa a 28°C por 48h. Posteriormente, as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de 15 ml para centrifugação a 1.200

× g por 3 min. Após duas lavagens com PBS 1X, os pellets foram transferidos para eppendorfs e a fixação ocorreu durante a noite a 4°C em uma solução contendo 2% (v/v) de paraformaldeído, 2% (v/v) de glutaraldeído e 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Em seguida, as preparações foram pós-fixadas, por 30 min em 2% (p/v) de tetróxido de ósmio, 1,6% de ferricianeto de potássio e 10 mM de CaCl₂ em 0,2 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. As amostras foram lavadas em água destilada e coradas em um bloco com 0,5% (p/v) de acetato de uranila por 24 h a 4°C. O material passou por desidratação em uma série graduada de acetona (50%–100%) por 10 min cada, e foi incorporado em resina Spurr. Seções ultrafinas foram obtidas usando um ultramicrotomo UC6 (Leica, Wetzlar, Alemanha) que foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. A etapa final foi examinar e fotografar as seções sob um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (TEM; Jeol 1011, Tóquio, Japão) a 80 kV.

3.3.11 Ensaio de fluorescência

O ensaio foi realizado utilizando células Vero cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de P/S a 37°C com 5% de CO₂. Células Vero foram semeadas em placas de 24 poços ($2,5 \times 10^5$ céls/poço) sobre lamínulas circulares de 13 mm dispostas em cada poço antes do plaqueamento. Depois de alcançarem a confluência de 90%, 1 µg/mL das moléculas auto fluorescentes ESE2F1-A e ESE2F1-D, diluída em meio DMEM não suplementado, foram adicionadas aos poços de tratamentos e incubou-se por 1 h a 37°C. Transcorrido 1 h, as células foram incubadas por 48 h em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após, os poços foram lavados três vezes com PBS 1X (pH 7,4) a 37°C e fixadas com formaldeído 4% por 30 min e lavados novamente com PBS. Os núcleos celulares foram corados com DAPI comercialmente disponível (300 nM) por 7 min em temperatura ambiente, de acordo com a recomendação do fabricante. As lamínulas foram montadas com ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e observados em um microscópio confocal de varredura a laser Leica SP5 (Leica Microsystems—Wetzlar Alemanha), excitado a 405 nm e seguido no canal verde (510-560 nm). Canal azul observado a 450-480 nm. Os ensaios foram realizados por triplicata experimental em três séries independentes.

3.3.12 *Análise estatística*

Todos os dados foram representados graficamente com o software GraphPad Prism® (San Diego, CA, EUA) versão 8.0.1, e a significância foi determinada por ANOVA one-way com o teste de comparações múltiplas de Tukey, exceto para estudos de viabilidade celular, que se utilizou análise de ajuste de curva de regressão não linear, e a concentração tóxica para as células foi determinada a partir da equação linear. Para todas as análises, $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos brutos

Os extratos vegetais de *Eugenia dysenterica* (Mart.) DC (ED), *Erythroxylum suberosum* (ES), *Miconia chamissois* Naudin (MC), *Morus nigra* Linné (MN) e *Sapindus saponaria* L. (SS), foram incubados com células Vero por 48 h, e os valores de CC_{50} foram calculados por regressão não linear (*curve fit*) (Figura 9). Na concentração de 0,310 mg/mL, todos os extratos apresentaram 100% de viabilidade celular.

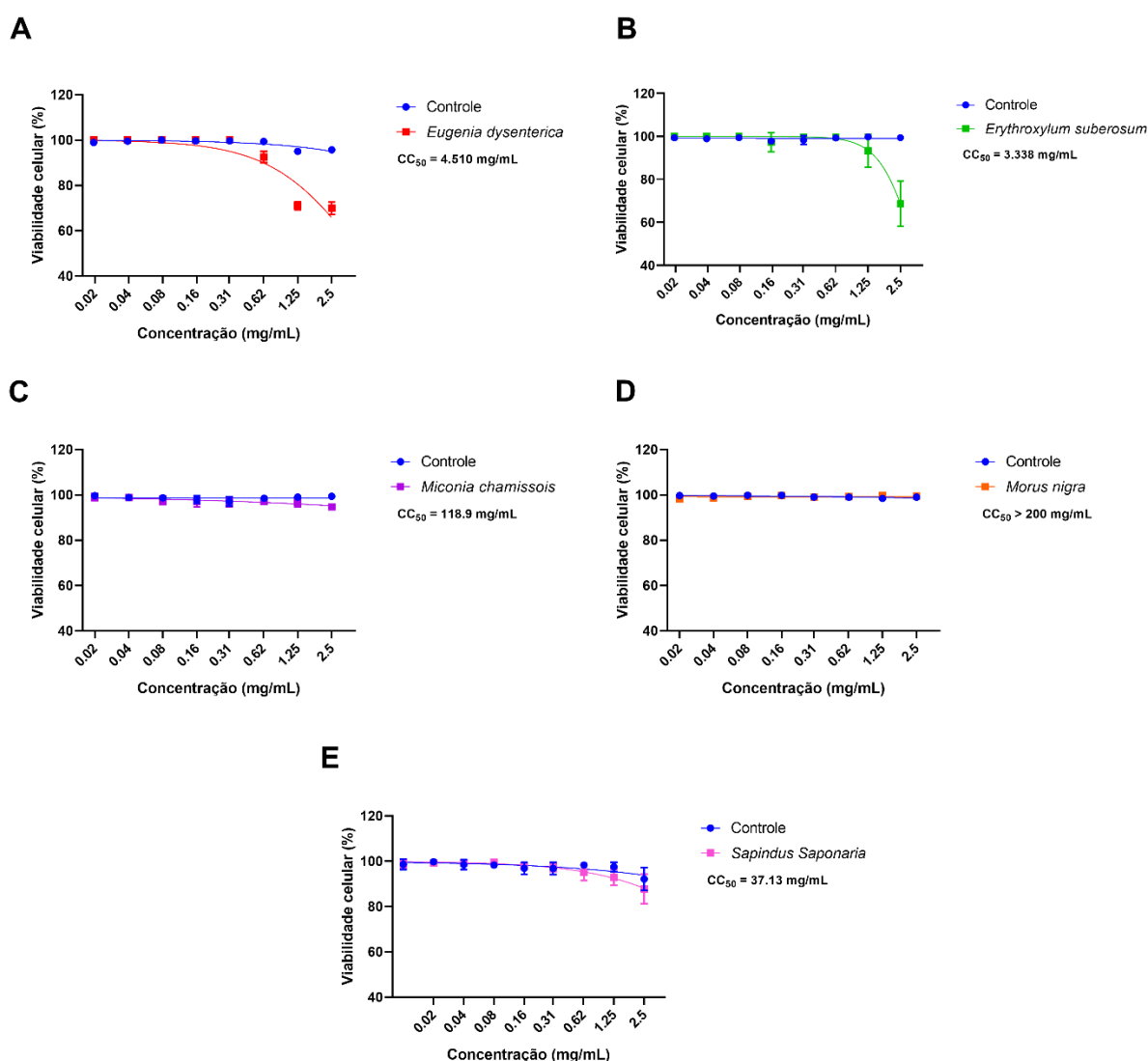


Figura 9. Ensaio de viabilidade lisossomal em células Vero incubadas por 48 h com diferentes concentrações dos extratos, de 0,02 a 2,5 mg/mL, sendo **A)** ED, **B)** ES, **C)** MC, **D)** MN e **E)** SS. Os experimentos foram realizados em triplicata com três experimentos independentes e analisados por regressão não linear e por one-way ANOVA com

múltiplas comparações do software GraphPad Prism (8.0.1). $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises.

De acordo com a concentração máxima investigada (2,5 mg/mL), os valores de CC_{50} foram 4,510 mg/mL, 3,338 mg/mL, 118,9 mg/mL, > 200 mg/mL e 37,13 mg/mL para ED, ES, MC, MN e SS, respectivamente. Em concentrações superiores a 1,25 mg/mL, observou-se efeitos citotóxicos de formação de vacúolos e lise celular nos tratamentos com ED e ES (Figura 9 A e B). Os extratos MC e MN permaneceram com 100% de viabilidade até na maior concentração teste, obtendo maiores números de CC_{50} (Figura 9 C e D).

3.4.2 *Análise da atividade antiviral dos extratos brutos*

Inicialmente, realizou-se uma triagem com os extratos vegetais na etapa pós-tratamento, de acordo com a linha do tempo exibida na Figura 8. Dentre os cinco extratos comparados, os extratos ED e ES mostraram-se promissores quanto a atividade antiviral por ensaio de placa de lise, apresentando atividade anti-CHIKV (Figura 10). Os demais extratos não apresentaram atividade anti-CHIKV, portanto não foram realizados mais testes com os extratos MC, MN e SS.

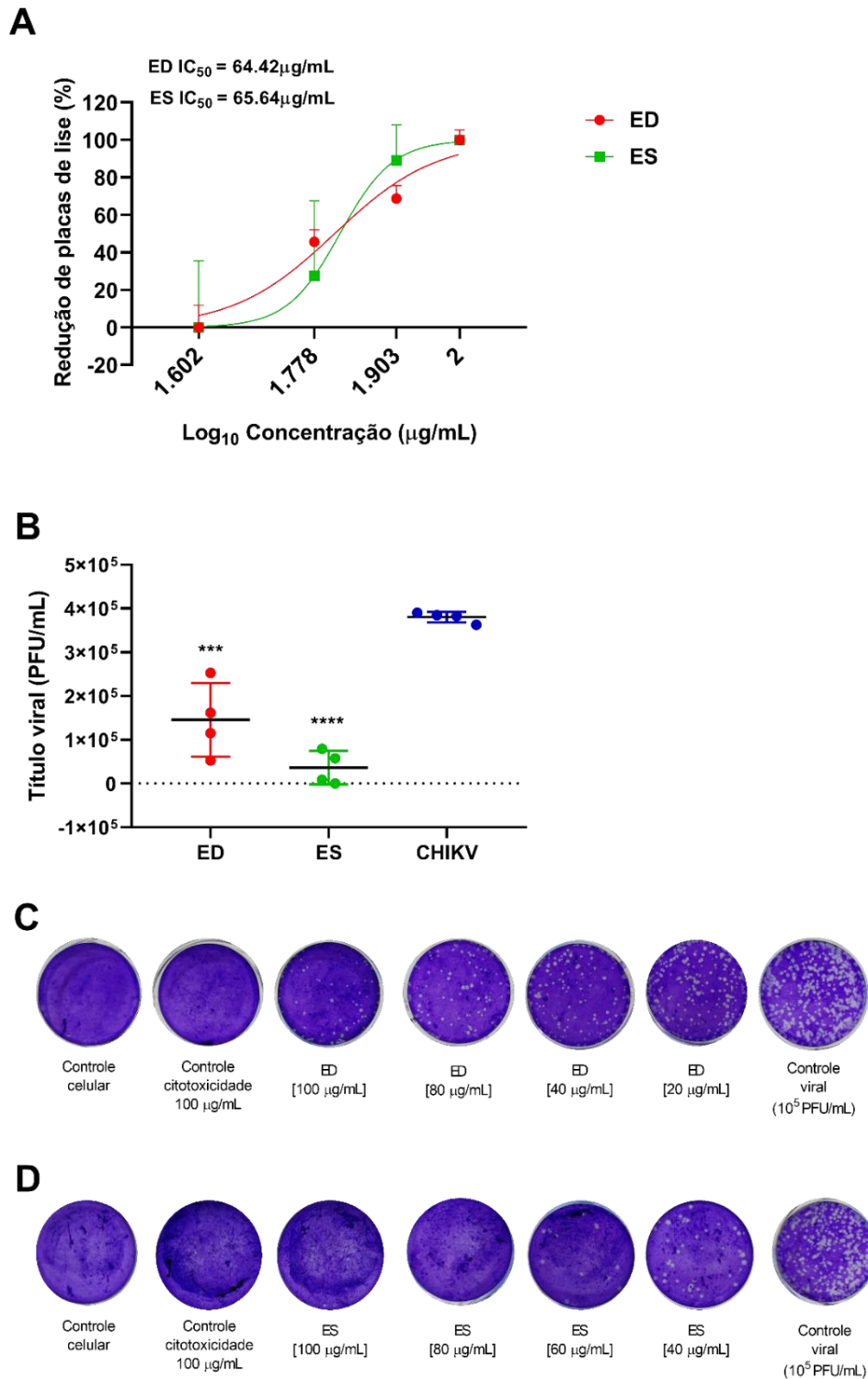


Figura 10. Atividade anti-CHIKV dos extratos ED e ES, na etapa de pós-tratamento, **A)** por redução do número de placas de lise em porcentagem e, **B)** por redução da média do título viral, para cada concentração testada, em PFU/mL. Os resultados são as médias e desvios padrão de três experimentos independentes. Nos itens **C)** e **D)** constam os ensaios de formação de placa de lise para os extratos ED e ES, respectivamente. A média do título do controle viral de CHIKV é $3,8 \times 10^5$ PFU/mL. Os valores de concentração inibitória 50% (IC_{50}) foram calculados usando análise de regressão não linear no software

GraphPad Prism (versão 8.01), plotando o log do inibidor *versus* a resposta normalizada (inclinação variável). $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, *** $p = 0.0004$; ***** $p < 0.0001$.

Na etapa de pós-tratamento, a redução da formação de placas de CHIKV foi superior a 70% na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ para ES. Já o extrato ED, reduziu a formação de placas de CHIKV em 70,5% na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com o cálculo de concentração inibitória 50% (IC_{50}), com 64,42 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{LogIC}_{50} = 1.809$) do extrato ED, inibe-se 50% do vírus, enquanto para o extrato ES, serão necessários 65,64 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{LogIC}_{50} = 1.817$) (Figura 10 A). Em resumo, conclui-se que os extratos ED e ES reduziram a média do título viral de CHIKV, de $3,8 \times 10^5$ PFU/mL para $5,28 \times 10^4$ PFU/mL e 0, respectivamente (Figura 10 B).

Visto que os extratos de ED e ES apresentaram atividade anti-CHIKV na etapa de pós-tratamento, investigou-se também a atividade antiviral dos extratos nas etapas de co- e pré-tratamento. O extrato ED reduziu em até 59 e 85% o número de placas de lise de CHIKV na concentração máxima testada, de 100 $\mu\text{g/mL}$, nas etapas de co- e pré-tratamento, respectivamente. Na etapa de co-tratamento, o extrato ES apresentou redução no número de placas de lise de aproximadamente 70% na menor concentração testada, de 5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, reduziu-se o número de placas de lise para 100%. Entretanto, na etapa de pré-tratamento, o extrato ES não apresentou atividade antiviral. Estes resultados demonstram que os extratos brutos de ED e ES têm potencial para investigação de biomoléculas anti-CHIKV (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de redução do número de placas para os extratos ED e ES frente a CHIKV em células Vero após 48 h.

Extrato	$\mu\text{g/mL}$	% de redução de CHIKV $\pm$ DP		
		Pós-tratamento ^a	Co-tratamento ^a	Pré-tratamento ^a
ED	40	33,85 $\pm$ 5,956	48,145 $\pm$ 8,792	23,908 $\pm$ 7,658
	60	53,405 $\pm$ 11,098	50,7 $\pm$ 10,129	65,232 $\pm$ 10,114
	80	69,461 $\pm$ 3,668	52,468 $\pm$ 5,585	77,872 $\pm$ 11,448
	100	87,96 $\pm$ 3,610	59,001 $\pm$ 19,706	85,414 $\pm$ 4,093
ES	5	30,765 $\pm$ 4,091	69,030 $\pm$ 10,453	Ns
	10	38,121 $\pm$ 6,810	96,853 $\pm$ 2,569	Ns
	20	54,889 $\pm$ 9,020	99,547 $\pm$ 0,609	Ns
	40	79,73 $\pm$ 7,187	100,00 $\pm$ 0,00	Ns
	60	85,316 $\pm$ 8,084	Ns	Ns

80	97,807 ± 3,798	Ns	Ns
100	100,00 ± 0,000	Ns	Ns

^a Os valores são da média ± desvio padrão de ensaios em triplicata para cada amostra. Foram calculados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.01) através de análise de regressão não linear.

Ns = Não significativo

Os extratos aquosos ED e ES apresentaram atividade antiviral contra CHIKV, principalmente nas estratégias de inibição nas etapas de pós e co-tratamento. Quanto ao ensaio citotoxicidade por viabilidade lisossomal, observa-se que o extrato ES possui um perfil mais citotóxico que ED. Portanto, ED contém moléculas antivirais menos citotóxicas que ES. Esse resultado foi confirmado pelo cálculo do índice de seletividade (IS), no qual ED apresentou os maiores índices de seletividade nas estratégias de inibição testadas de pós e pré-tratamento (Tabela 4).

Entretanto, na estratégia de co-tratamento, ES demonstrou ter grande potencial de investigação de moléculas antivirais, devido ao seu alto IS (>920). A partir dos resultados obtidos, avançamos para o fracionamento guiado pela bioatividade dos extratos aquosos brutos de ED e ES de acordo com o fluxograma da figura 11.

Tabela 4. Índice de Seletividade (IS) da atividade anti-CHIKV dos extratos *E. dysenterica* (ED) e *E. suberosum* (ES).

Extrato	Índice de Seletividade ^a		
	Pós-tratamento	Co-tratamento	Pré-tratamento
ED	70,00931	79,72424	50,42487
ES	50,85314	920,5736	Nd

^a Os valores são referentes a equação = CC_{50}/IC_{50} dos ensaios de placa de lise nas três etapas de tratamento. A CC_{50} e IC_{50} foram calculados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.01) através de interpolação e de análise de regressão não linear.

Nd = Não determinado

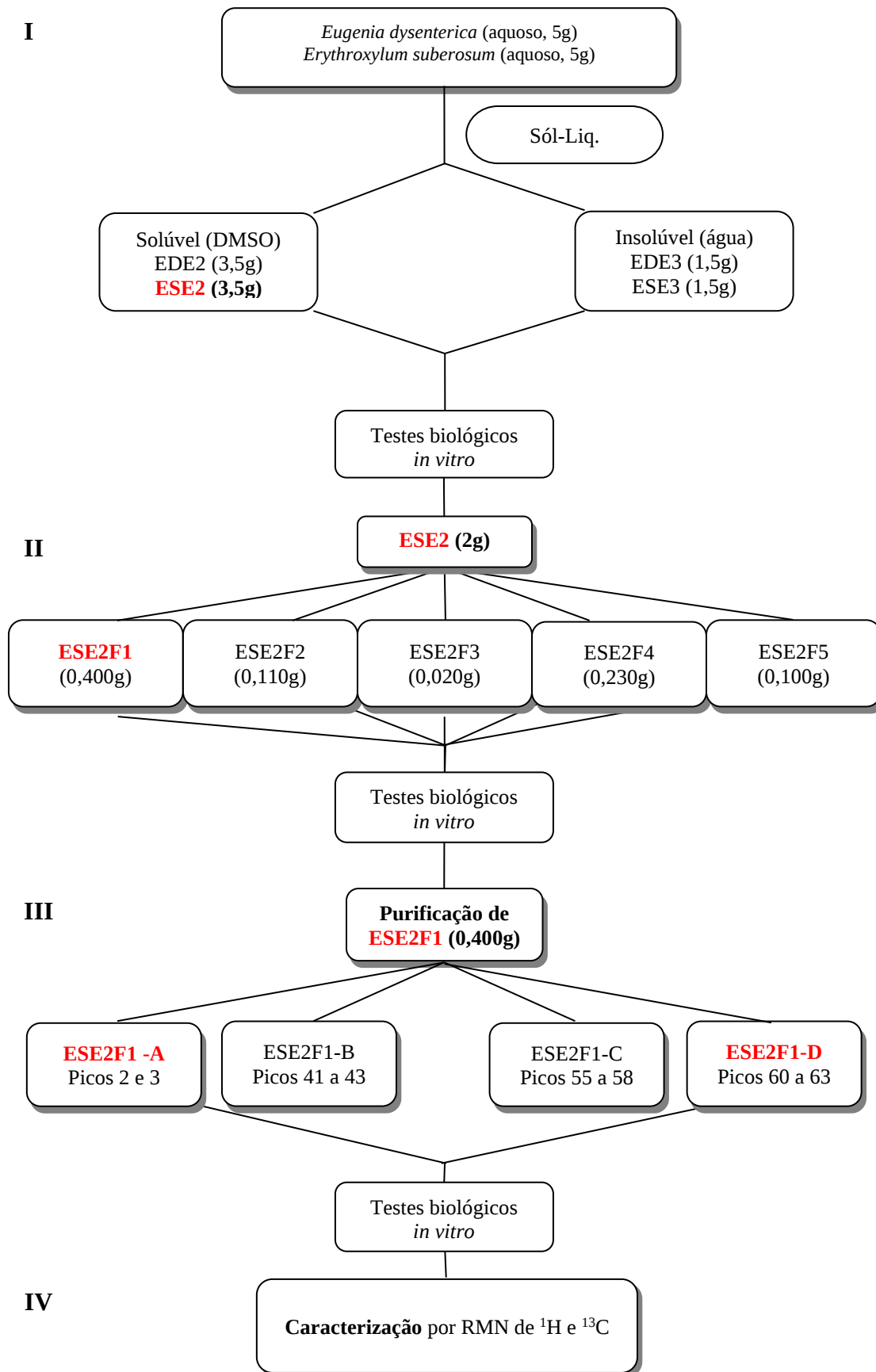


Figura 11. Fluxograma esquemático do fracionamento e isolamento da molécula com atividade anti-chikungunya. **I)** Inicialmente, 5g de cada extrato bruto aquoso de *Eugenia*

dysenterica (ED) e *Erythroxylum suberosum* (ES) foram submetidos a partição sólido-líquido com 200 mL de metanol. **II)** Após a obtenção das frações solúveis (ressuspendidas em DMSO) e insolúveis (ressuspendidas em água), realizou-se a cromatografia em coluna (CC), em camada delgada (CCD) e os testes biológicos *in vitro* (citotoxicidade e antiviral). **III)** De acordo com os perfis cromatográficos obtidos e os resultados dos antivirais, avançou-se para o fracionamento da fração ESE2 por CC seguida de CCD, além da realização de novos testes biológicos. Nessa etapa obtivemos cinco subfrações. **IV)** Após obtenção das cinco subfrações e novos testes *in vitro*, observou-se que a subfração ESE2F1 foi promissora nos testes *in vitro*, além de ser uma molécula com maior grau de pureza quando comparada com as demais. Portanto, avançou-se para etapa de elucidação estrutural para identificar qual ou quais são as moléculas presentes.

3.4.3 Partição sólido-líquido dos extratos ED e ES

Cerca de 5g de cada extrato bruto aquoso (ED e ES) foram submetidos a partição sólido-líquido com 200 mL de metanol. Os solubilizados foram transferidos para um balão de separação e obteve-se as fases solúveis (EDE2 e ESE2), e as fases insolúveis (EDE3 e ESE3). As fases foram reduzidas com auxílio do rotoevaporador a 80 rpm, temperatura de 50° C, e pressão 600 mmHg por aproximadamente 2 h, para total evaporação do metanol das amostras. Os rendimentos das fases solúveis, que foram diluídas em dimetilsufóxido 0.01% (DMSO), foram de 3,5g (70%) e, das fases insolúveis, que foram diluídas em água 1:1 (m/v), foram e 1,5g (30%).

3.4.4 Caracterização farmacognóstica por CCD, avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-CHIKV das frações dos extratos ED e ES

As frações EDE2, EDE3, ESE2 e ESE3, obtidas por partição sólido-líquido, foram avaliadas por CCD utilizando reagente para detecção dos principais grupos funcionais de compostos do metabolismo vegetal como terpenos, compostos nitrogenados, polifenóis (especialmente flavonoides), cumarinas, saponinas e ácidos de cadeia longa.

A CCD é um método rápido, eficiente, e de baixo custo utilizado no controle da qualidade de plantas medicinais, tanto em matéria-prima vegetal quanto em fitoterápicos derivados. É uma técnica utilizada no monitoramento de processos extrativos que visam separar, identificar e/ou quantificar compostos ou misturas menos complexas (Amir, et al 2013). A análise preliminar com o revelador ácido cérico mostrou a presença de bandas de coloração característica para compostos carbonílicos, terpênicos e fenólicos (Figura 12).

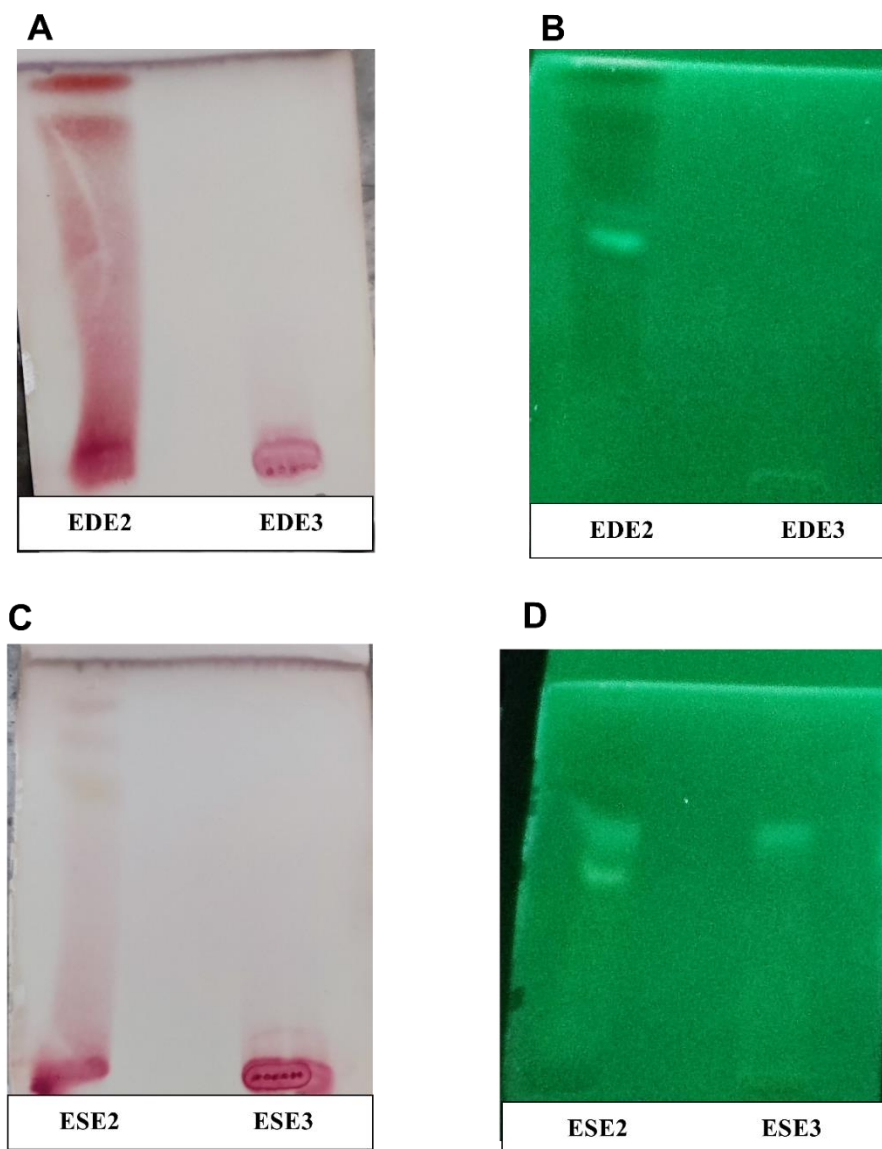


Figura 12. Perfil cromatográfico (CCD) para as frações de **A)** e **B)** EDE2 e EDE3, **C)** e **D)** ESE2 e ESE3. Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada, 100:11:11:26 (v/v/v/v); Revelador: Ácido cérico. Os perfis das figuras **B)** e **D)** foram obtidos após borrifar o revelador e visualizar em câmara UV a 365 nm.

As frações dos extratos vegetais de ED (EDE2 e EDE3) e ES (ESE2 e ESE3), foram incubados com células Vero por 48 h, para avaliar o efeito citotóxico. Na concentração máxima testada, de 50 µg/mL, todas as frações apresentaram 100% de viabilidade celular (Figura 13).

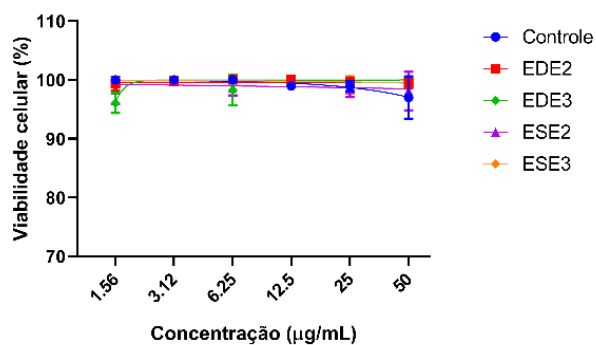


Figura 13. Ensaio de viabilidade lisossomal em células Vero incubadas por 48 h com diferentes concentrações das frações, de 1,56 a 50 µg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata com três experimentos independentes e analisados por regressão não linear e por one-way ANOVA com múltiplas comparações do software GraphPad Prism (8.0.1). $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises.

Após obtenção do perfil citotóxico e identificação da concentração não-citotóxica para as etapas seguintes, analisou-se a atividade anti-CHIKV das frações nas etapas de pós- e co-tratamento nas concentrações de 1; 2,5; 5 e 10 µg/mL, por ensaio de placa de lise (Figura 14).

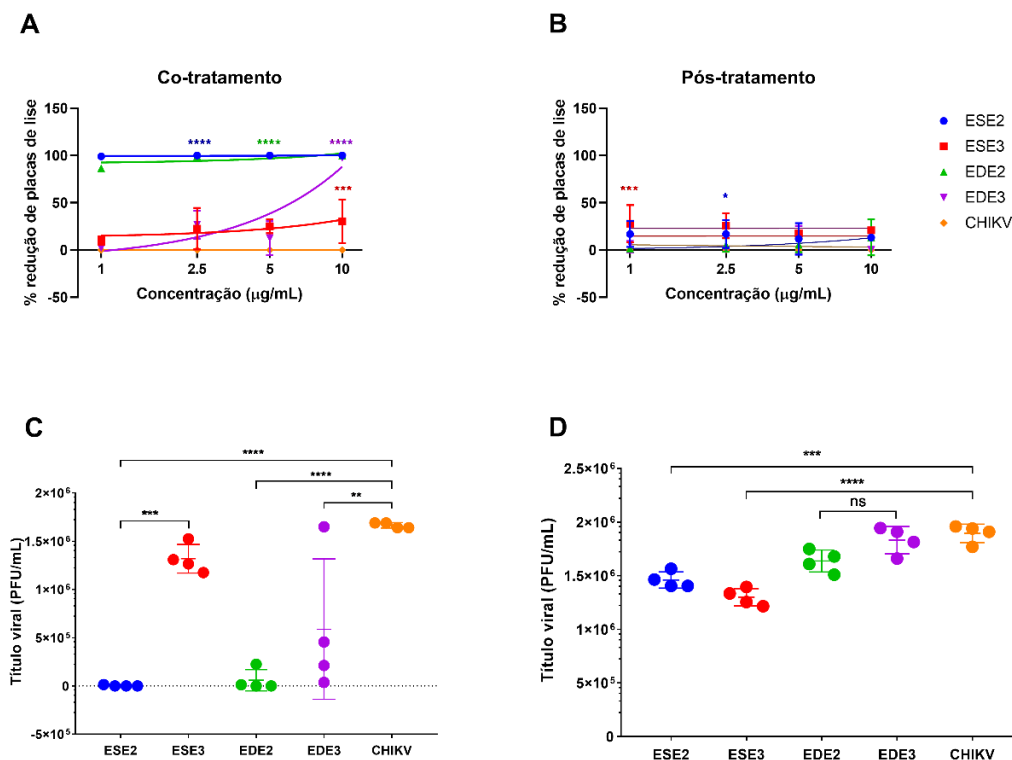


Figura 14. Atividade antiviral das frações ESE2, ESE3, EDE2 e EDE3 contra CHIKV. Etapa de co-tratamento: **A)** Redução do número de placas de lise em porcentagem e, **C)** Redução da média do título viral, para cada concentração testada, em PFU/mL. Etapa de pós-tratamento: **B)** Redução do número de placas de lise em porcentagem e, **D)** Redução da média do título viral, para cada concentração testada, em PFU/mL. Os resultados são as médias e desvios padrão de três experimentos independentes. A média do título do controle viral de CHIKV na etapa de co-tratamento e de pós-tratamento foi de $1,67 \times 10^6$ e $1,90 \times 10^6$ PFU/mL, respectivamente. Os resultados foram avaliados estatisticamente através do software GraphPad Prism (versão 8.01), sendo A) e B) através da análise de regressão linear e por two-way ANOVA com múltiplas comparações, C) e D) por one-way ANOVA com múltiplas comparações. $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises.

E geral, as porcentagens de redução de placas de lise das frações na etapa de co-tratamento foram superiores às porcentagens de redução de placa na etapa de pós-tratamento. Na etapa de co-tratamento, as frações solúveis ESE2 e EDE2 apresentaram os melhores resultados anti-CHIKV. Na concentração de 1 µg/mL, a fração ESE2 obteve $99,14\% \pm 1,204$ de redução de placas de lise, e na mesma concentração, a fração EDE2 obteve $86,66\% \pm 3,415$ de redução. Ambas as frações apresentaram $100\% \pm 0,000$ de redução a partir da concentração de 5 µg/mL (Figura 14 A).

Na concentração de 10 µg/mL, a fração EDE3 reduziu o número de placas de lise anti-CHIKV em $97,53\% \pm 3,492$, e $26,92\% \pm 14,888$ com 2,5 µg/mL. Além disso, a

fração ESE3 reduziu o número de placas de lise aproximadamente $30\% \pm 23,100$ com $10 \mu\text{g/mL}$ (Figura 14 A). Portanto, todas as frações apresentaram atividade anti-CHIKV na etapa de co-tratamento. Esses resultados são confirmados na figura 14 C, que demonstra a comparação das médias dos títulos virais dos tratamentos com a média do título do controle viral (CHIKV) em PFU/mL. Ao comparar o título viral das frações ESE2 e EDE2, nota-se diferença estatística, ambas diminuindo o controle viral de $1,67 \times 10^6$ PFU/mL para 0, em $10 \mu\text{g/mL}$. Em resumo, os resultados ratificam a diminuição de 100% do título viral de CHIKV em relação as frações ESE2 e EDE2.

Na etapa de pós-tratamento, as frações apresentaram baixa atividade anti-CHIKV. Os melhores resultados foram obtidos por ESE2 e ESE3, que apresentaram porcentagem de redução do número de placas de lise de $16,92\% \pm 13,752$ e $27,98\% \pm 19,777$, respectivamente (Figura 14 B). As frações do extrato ED (EDE2 e EDE3) não apresentaram atividade anti-CHIKV significativas quando comparadas entre si ou com o controle viral (Figura 14 D). Com base nos resultados obtidos, avançamos para o fracionamento da fração de ESE2, investigamos o perfil citotóxico das subfrações obtidas, e avaliamos na etapa de co-tratamento a atividade anti-CHIKV das subfrações.

3.4.5 Caracterização farmacognóstica por CCD, avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-CHIKV da fração do extrato ES (ESE2)

Para o fracionamento da ESE2, utilizamos a coluna cromatográfica Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich) como fase estacionária e metanol como fase móvel. A coluna de vidro de 2,3 cm de diâmetro e 49,5 cm de comprimento, foi empacotada colocando a mistura da fase sólida com metanol, pela parte superior. Manteve-se o fluxo contínuo de fase móvel até obter o grau de empacotamento adequado. A fase sólida ocupou um comprimento de 27,5 cm. As condições cromatográficas estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Condições cromatográficas experimentais da separação do ESE2 em coluna de Sephadex LH-20.

Condição	Característica
Coluna	Vidro
Diâmetro	2,3 cm
Comprimento	49,5 cm
Fase estacionária	Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich)
Tamanho da partícula	25 – 100 μm

Volume ocupado pela fase estacionária	114 cm ³
Mass da fase estacionária	20 g
Fase móvel	Metanol
Fluxo	1,4 mL/min
Tempo de coleta da fração	5 min
Tempo total da coleta	390 min

A fração ESE2 (2 g) foi solubilizada em metanol (5 mL), utilizando banho ultrassom por 20 minutos. Em seguida, a fração solubilizada foi adicionada pela parte superior da coluna e imediatamente foi acrescentado metanol, visando manter um perfil de eluição homogêneo no sistema cromatográfico. Coletou-se 5 subfrações majoritárias a cada 5 minutos, por um tempo total de 390 minutos, e concentradas em banho-maria (QUIMIS modelo Q334M-28) a 40 °C. Subsequentemente, estudou-se o perfil cromatográfico das subfrações por CCD (Figura 15).

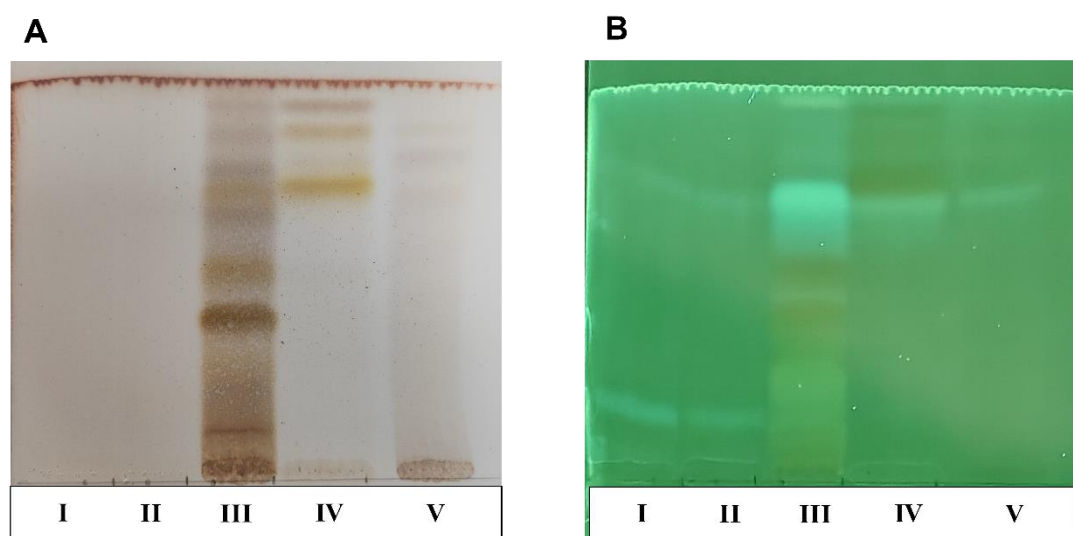


Figura 15. Perfil cromatográfico (CCD) para as subfrações de ESE2. **A)** I: ESE2F1, II: ESE2F2, III: ESE2F3, IV: ESE2F4 e V: ESE2F5. Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada, 100:11:11:26 (v/v/v/v); Revelador: Ácido cérico. O perfil da figura **B)** foi obtida após borrifar o revelador e visualizar em câmara UV a 365 nm.

As cinco subfrações obtidas de ESE2, foram incubadas com células Vero por 48 h, para avaliar o efeito citotóxico. Na concentração 0,5 µg/mL, todas as subfrações apresentaram viabilidade celular superior a 86%, sendo 89,50% ± 4,779; 87,91% ± 4,812;

86,7% $\pm$ 6,586; 99,29% $\pm$ 1,230 e; 100% $\pm$ 0.000, para ESE2F1, ESE2F2, ESE2F3, ESE2F4 e ESE2F5, respectivamente (Figura 16).

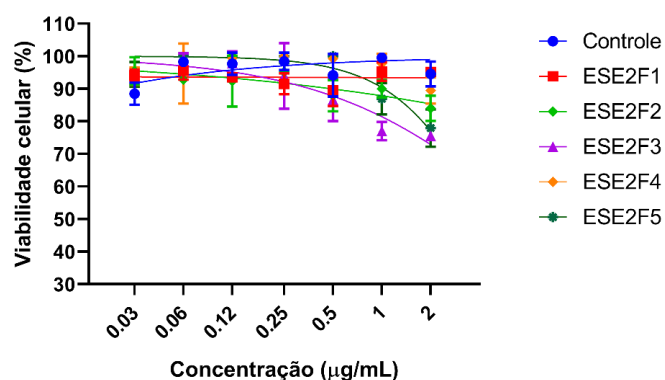


Figura 16. Ensaio de viabilidade lisossomal em células Vero incubadas por 48 h com diferentes concentrações (0,03 a 2 µg/mL) das cinco subfrações de ESE2. Os experimentos foram realizados em triplicata com três experimentos independentes e analisados por regressão não linear e por one-way ANOVA com múltiplas comparações do software GraphPad Prism (8.0.1). $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises.

Após obtenção do perfil citotóxico e identificação da concentração não-citotóxica para as etapas seguintes, analisou-se a atividade anti-CHIKV das subfrações na etapa de co-tratamento nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 ng/mL, por ensaio de placa de lise (Figura 17).

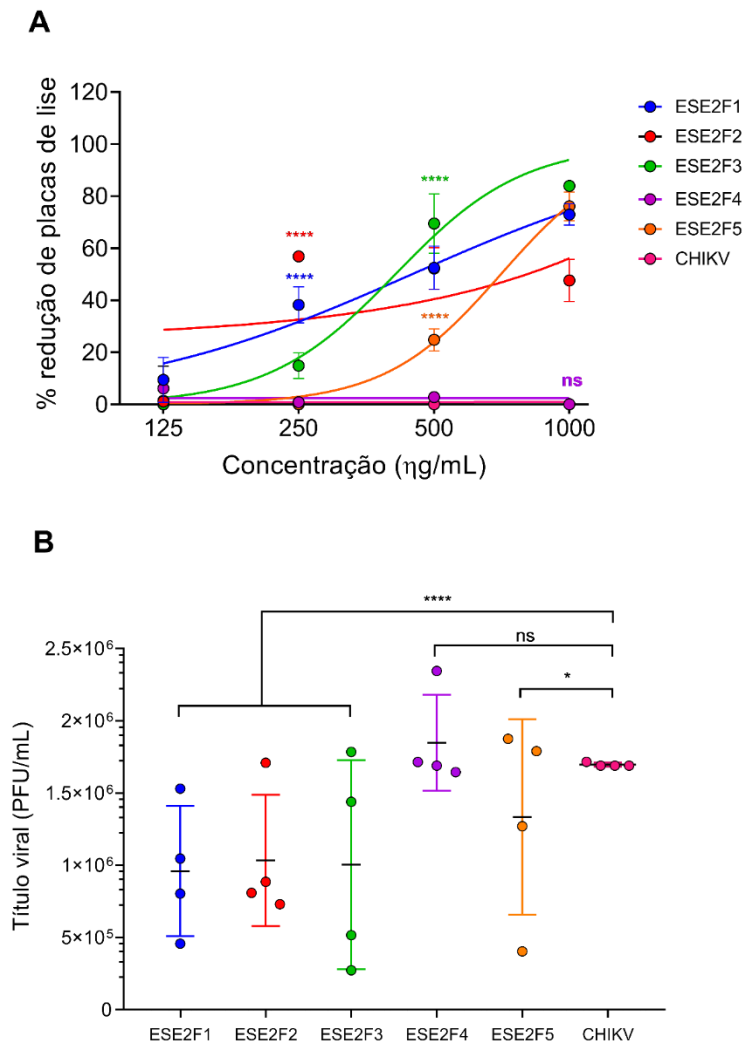


Figura 17. Atividade anti-CHIKV das subfrações de ESE2 na etapa de co-tratamento, **A)** por redução do número de placas de lise em porcentagem e, **B)** por redução da média do título viral, para cada concentração testada, em PFU/mL. Os resultados são as médias e desvios padrão de três experimentos independentes. A média do título do controle viral de CHIKV foi de $1,70 \times 10^6$ PFU/mL. Os resultados foram avaliados estatisticamente através do software GraphPad Prism (versão 8.01) por regressão não linear e por two-way ANOVA com múltiplas comparações. $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises. **** $p < 0,0001$; * $p = 0,0255$.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de placa de lise, na etapa de co-tratamento, observou-se que todas as subfrações de ESE2 apresentaram atividade anti-CHIKV, exceto a subfração ESE2F4, que na maior concentração testada (1000 ng/mL) não reduziu o número de placas de lise. Entre as demais subfrações, ESE2F3 apresentou a maior redução do número de placas de lise, com $83,88\% \pm 0,295$ em 1000 ng/mL, e $69,45\% \pm 11,446$ em 500 ng/mL (figura 17 A). Ao visualizarmos a CCD (figura 15 A),

observamos que esse resultado é esperado, pois o perfil cromatográfico de ESE2F3 mostra a presença de várias bandas, ou seja, a presença de várias moléculas nessa subfração. Além disso, apresenta o perfil mais citotóxico quando comparamos com as outras subfrações (figura 16).

Na concentração de 250 $\eta\text{g/mL}$, observamos que ESE2F2 reduziu o número de placas de lise em $56,79\% \pm 1,388$. Entretanto, com 125 $\eta\text{g/mL}$ não houve atividade anti-CHIKV para ESE2F2 ($1,11\% \pm 1,571$) e ESE2F5 ($1,38\% \pm 1,964$). Em 500 $\eta\text{g/mL}$, ESE2F5 reduziu o número de placas de lise em $24,8\% \pm 4,214$, à medida que na mesma concentração a subfração ESE2F1 reduziu o dobro, em $52,44\% \pm 8,330$. Observamos ainda que ESE2F1 e ESE2F5 apresentaram número de redução de placas de lise semelhantes ao utilizarmos a concentração de 1000 $\eta\text{g/mL}$, com $72,93\% \pm 4,145$ e $76,11\% \pm 5,500$, respectivamente (figura 17 A).

Esses resultados são confirmados na figura 17 B, que demonstra a comparação das médias dos títulos virais dos tratamentos com a média do título do controle viral em PFU/mL. Ao comparar o título viral das subfrações ESE2F1, ESE2F3 e ESE2F5 com 1000 $\eta\text{g/mL}$, com o controle viral (CHIKV), notou-se diferença estatística, reduzindo o título do controle viral de $1,70 \times 10^6$ PFU/mL para $4,58 \times 10^5$, $1,37 \times 10^5$ e $2,73 \times 10^5$ PFU/mL, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos após o ensaio antiviral, e ao visualizarmos os perfis das subfrações ESE2F1-5 (I a V), percebemos que as subfrações ESE2F1 e ESE2F2 (I e II) e ESE2F4 e ESE2F5 (IV e V) apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (Figura 15), portanto concentramos essas duas subfrações com objetivo de obter moléculas mais puras possíveis. Após, decidimos realizar uma segunda análise por CCD das novas subfrações ESE2F1 (I+II), ESE2F3 (apenas III) e ESE2F5 (IV+V). Considerando os perfis cromatográficos e através dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, observamos que a subfração ESE2F1 apresentou apenas duas bandas majoritárias na CCD, após visualização na câmara UV a 365 nm (Figura 18 B), porém não identificadas com o revelador de ácido cérico (Figura 18 A). Portanto, avançamos para o isolamento e elucidação estrutural dessas moléculas presentes nessas bandas, para caracterizarmos a(s) molécula(s) que apresenta(m) atividade anti-CHIKV.

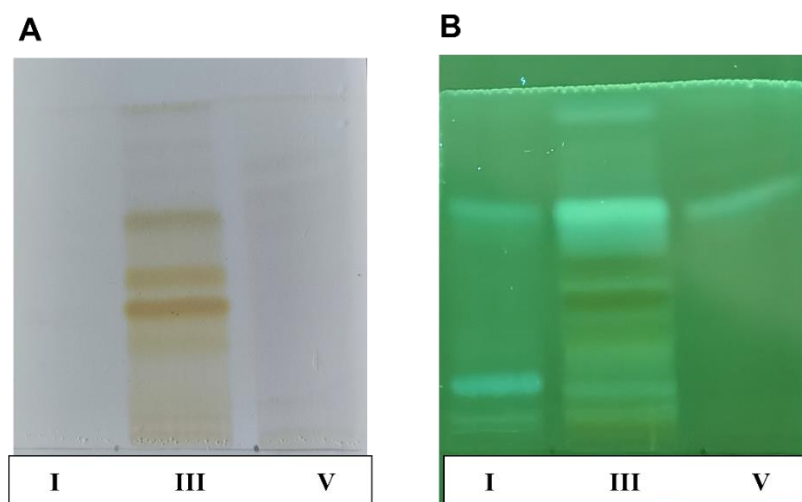


Figura 18. Perfil cromatográfico (CCD) para as subfrações de ESE2. Sendo, I: ESE2F1+ESE2F2, III: apenas ESE2F3, e V: ESE2F4+ESE2F5. **A)** Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água destilada, 100:11:11:26 (v/v/v/v); Revelador: Ácido cérico. O perfil da figura **B)** foi obtida após borrifar o revelador e visualizar em câmara UV a 365 nm.

3.4.6 Isolamento, avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-CHIKV das moléculas presentes na subfração ESE2F1

Para obtenção e caracterização das moléculas presentes na subfração ESE2F1, utilizou-se o método de separação por CC de acordo com a metodologia do item 3.3.3. Os compostos foram purificados em um sistema de cromatografia flash automática Büchi Sepacore (Hendrik-Ido-Ambacht, Holanda) X10/X50 utilizando a fase móvel de H₂O-AcCN com uma proporção 9:1. O sistema Büchi Sepacore foi equipado com dois módulos de bomba Büchi C-605, uma unidade de controle Büchi C-620, um coletor de frações Büchi C-660 e um fotômetro UV Büchi C-640.

Foram coletadas 63 alíquotas em tubos de ensaio de 50 mL (volume final 20 mL), e o perfil cromatográfico foi analisado por CCD. Subfrações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, obtendo um total de 4 subfrações (A: 2 e 3; B: 41 a 53; C: 55 a 58; e D: 60 a 63). Observou-se no cromatograma (210 nm), a presença de dois picos majoritários, que compreendem as subfrações A (ESE2F1-A) e D (ESE2F1-D), portanto, decidiu-se isolar as moléculas presentes nesses picos para continuar o ensaio bio-guiado (Figura 19).

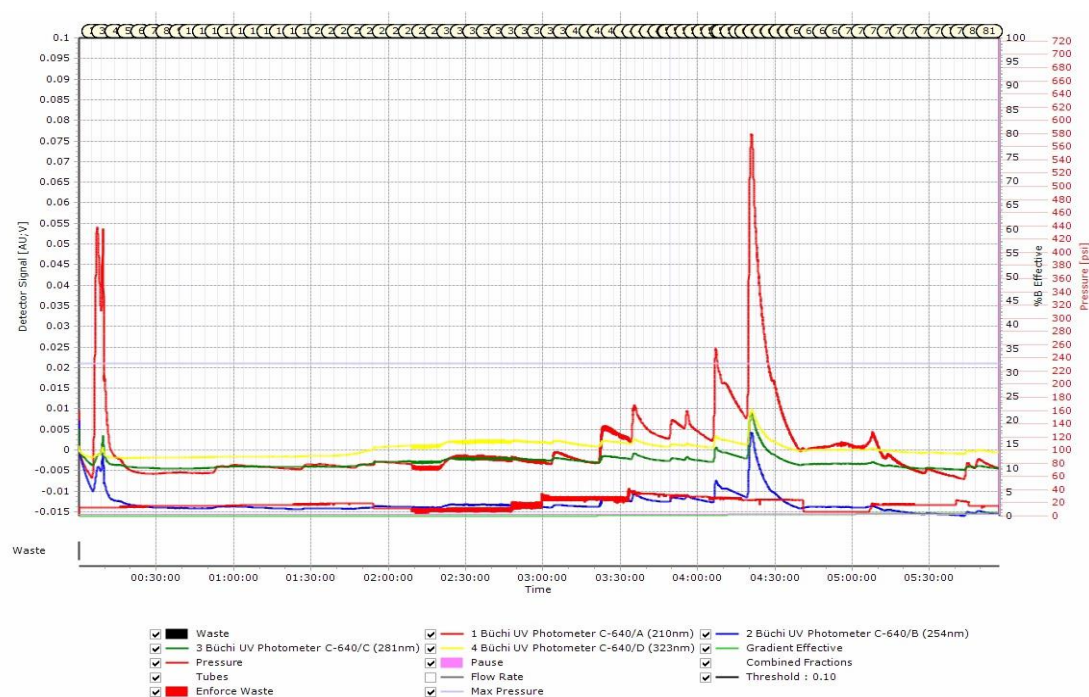


Figura 19. Perfil cromatográfico da subfração ESE2F1, obtido por Büchi Sepacore system equipado com dois módulos de bomba Büchi C-605, uma unidade de controle Büchi C-620, um coletor de frações Büchi C-660, e um fotômetro UV Büchi C-640. Absorbância verde: 281 nm; vermelho: 210 nm; amarelo: 323 nm; azul: 254 nm.

A subfração ESE2F1-A foi diluída em 3 mL de EtOH/H₂O (3:1), e ESE2F1-D foi diluída em 2 mL de etanol, obtendo concentrações finais de 76,6 e 75 mg/mL, respectivamente. Ambas subfrações foram evaporadas sob pressão reduzida e temperatura de 45° C, por 2 h. Após concentração das moléculas, realizou-se a avaliação da citotoxicidade em células e da atividade anti-CHIKV.

As duas moléculas obtidas de ESE2F1, foram incubadas com células Vero por 48 h, para avaliar o efeito citotóxico. Na concentração máxima de 2 µg/mL, a molécula ESE2F1-A apresentou viabilidade celular superior a 96% ± 0,680, enquanto a molécula ESE2F1-D apresentou um perfil mais citotóxico, com 50,83% ± 4,156, na mesma concentração (Figura 20). Entretanto, na concentração 0,500 µg/mL, as moléculas apresentaram viabilidade celular superior a 80%, sendo 100% ± 0,00 e 81,67% ± 3,791 para ESE2F1-A e ESE2F1-D, respectivamente.

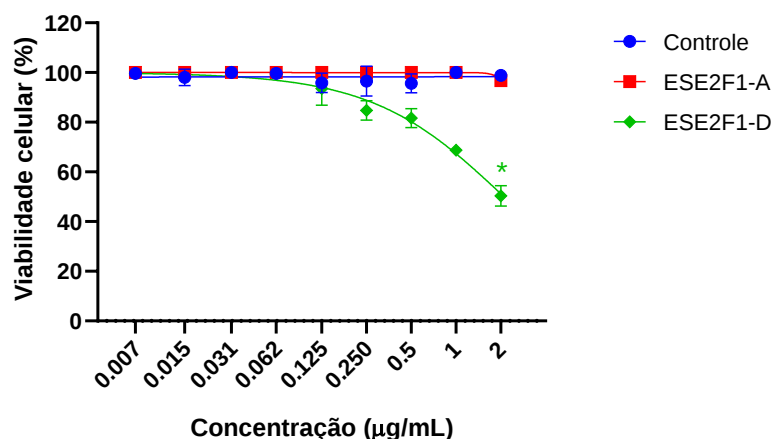


Figura 20. Ensaio de viabilidade lisossomal em células Vero incubadas por 48 h com diferentes concentrações das duas moléculas da subfração de ESE2F1: ESE2F1-A e ESE2F1-B. Os experimentos foram realizados em triplicata com três experimentos independentes e analisados por regressão não linear e por one-way ANOVA com múltiplas comparações do software GraphPad Prism (8.0.1). $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos para todas as análises; * $p = 0,0360$.

Após obtenção do perfil citotóxico e identificação da concentração não-citotóxica para as etapas seguintes, analisou-se a atividade anti-CHIKV das subfrações na etapa de co-tratamento nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 $\eta\text{g/mL}$, por ensaio de placa de lise (Figura 21).

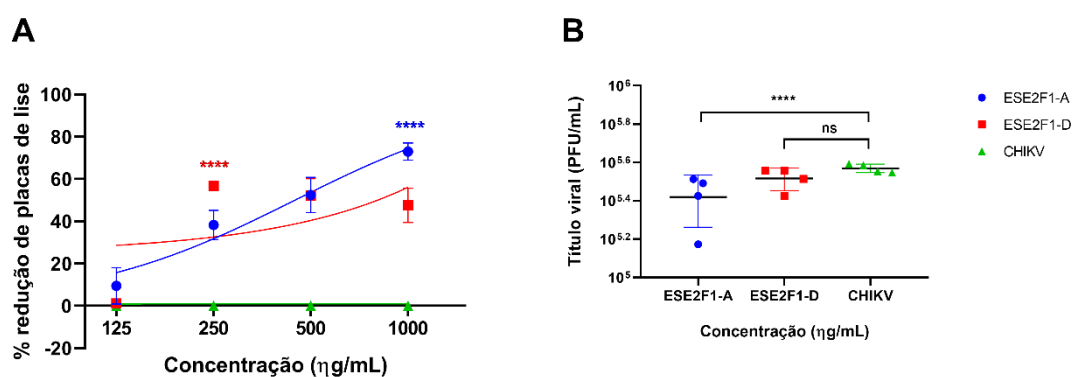


Figura 21. Atividade anti-CHIKV das moléculas ESE2F1-A e ESE2F1-D, na etapa de co-tratamento, **A)** por redução do número de placas de lise em porcentagem e, **B)** por redução da média do título viral, para cada concentração testada, em PFU/mL. Os resultados são as médias e desvios padrão de três experimentos independentes. A média do título do controle viral de CHIKV foi de $3,71 \times 10^5$ PFU/mL. Os resultados foram avaliados estatisticamente através do software GraphPad Prism (versão 8.01) por regressão não linear e por two-way ANOVA com múltiplas comparações. $p < 0,05$ foram

considerados estatisticamente significativos para todas as análises. **** $p < 0.0001$; ns = não significativo.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de placa de lise, na etapa de co-tratamento, observou-se que a molécula ESE2F1-A apresentou maior redução de placas de lise que a molécula ESE2F1-D. Com 250 $\eta\text{g/mL}$, as moléculas ESE2F1-A e ESE2F1-B reduziram o número de placas de lise em $38,21\% \pm 6,909$ e $56,7\% \pm 1,389$, respectivamente. Entretanto, quando aumentamos a concentração de ESE2F1-A para 1000 $\eta\text{g/mL}$, notamos um aumento da atividade antiviral para $72,97\% \pm 4,145$, enquanto houve um decréscimo da atividade da molécula ESE2F1-D anti-CHIKV, para $47,6\% \pm 8,113$. Com 125 $\eta\text{g/mL}$, observamos que não houve atividade anti-CHIKV para ambas as moléculas (Figura 21 A).

A figura 21 B confirma os resultados anteriores pela comparação das médias dos títulos virais dos tratamentos com a média do título do controle viral em PFU/mL. Ao comparar o título viral de 1000 $\eta\text{g/mL}$ de ESE2F1-A, com o controle viral (CHIKV), notou-se diferença estatística, reduzindo o título do controle viral de $3,71 \times 10^5$ PFU/mL para $1,49 \times 10^5$ PFU/mL.

3.4.7 Microscopia confocal de células Vero estimuladas com ESE2F1-A e ESE2F1-

D

Devido às suas características auto fluorescentes, realizamos um ensaio de imagem confocal das moléculas com objetivo de obter a localização das moléculas em células não infectadas após 48 h (Figura 22). Células Vero estimuladas ou não apresentaram morfologia bem conservada, com núcleos e nucléolos bem definidos. Observamos que as células estimuladas com 1000 $\eta\text{g/mL}$ de cada molécula, apresentaram padrões de células em divisão celular, possivelmente na etapa de anáfase (Figura 22 F e J). Esse padrão foi observado em vários campos de células Vero estimuladas, em contrapartida, não foi observado no controle celular.

De acordo com a localização das moléculas, podemos supor que elas agem diretamente nos estágios iniciais de endocitose do CHIKV, podendo interagir com os endossomos que são formados na célula, para liberação do genoma de RNA viral no citoplasma celular.

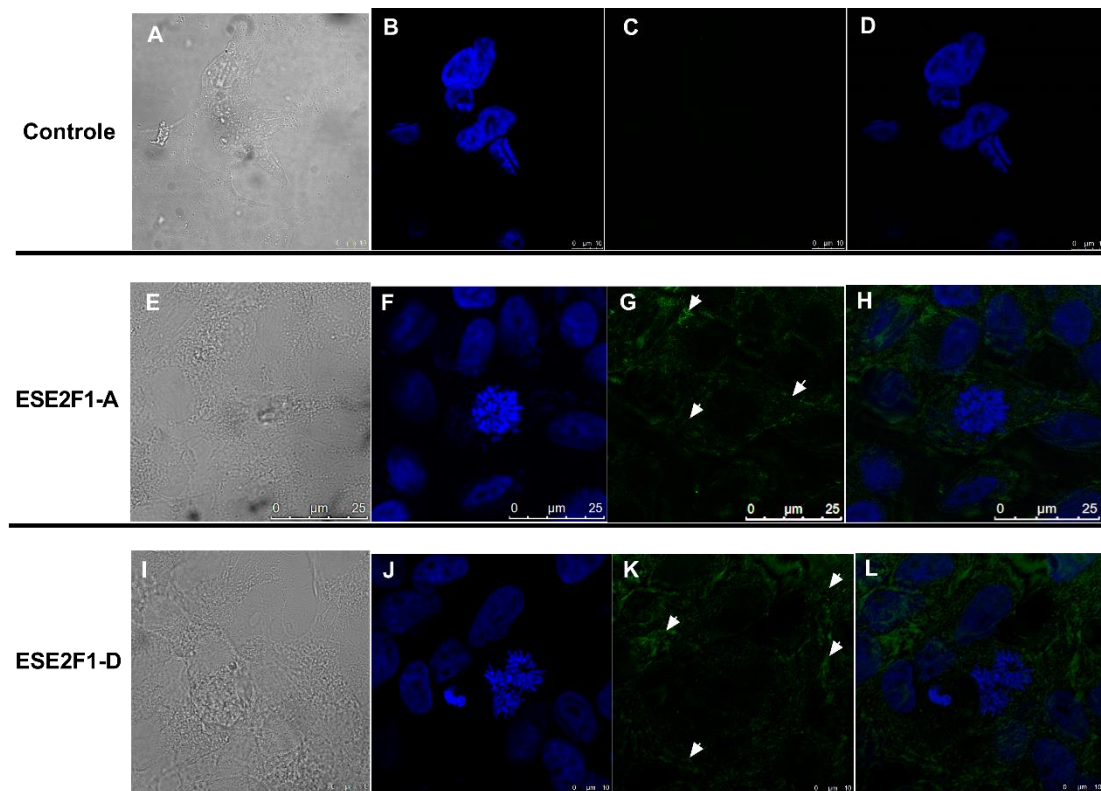


Figura 22. Microscopia confocal de células Vero estimuladas ou não, por 48 h, com as moléculas ESE2F1-A e ESE2F1-D. **A-C)** Células Vero sem estímulo; **E-G)** Células Vero com 1000 ng/mL de ESE2F1-A; **I-K)** Células Vero com 1000 ng/mL de ESE2F1-D; e **D, H e L)** são sobreposições do controle, ESE2F1-A e ESE2F1-D, respectivamente. As setas brancas mostram as moléculas dispersas no citoplasma (verde), mostrando que não colocalizam com o núcleo (azul). As barras de escala de ESE2F1-A compreendem em 25 μm , e as demais 10 μm .

3.4.8 Microscopia eletrônica de transmissão de células C6/36 infectadas com CHIKV

Células C6/36 (*Ae. albopictus*) não infectadas apresentaram uma morfologia bem definida, com vesículas que parecem ser autofagossomos e mitocôndrias aparentemente intactas (Figura 23 A, B). Após 48 h de infecção, podemos observar uma grande produção de mitocôndrias com morfologia alongada anormal, com membranas do núcleo e nucléolo bem preservados, apesar de menos eletrodensos. Estruturas semelhantes a endossomos podem ser vistos, juntamente com um número elevado de vírions brotando (Figura 23 C, D, E). Esse padrão também é observado para outros *Alphavirus*, como o MAYV.

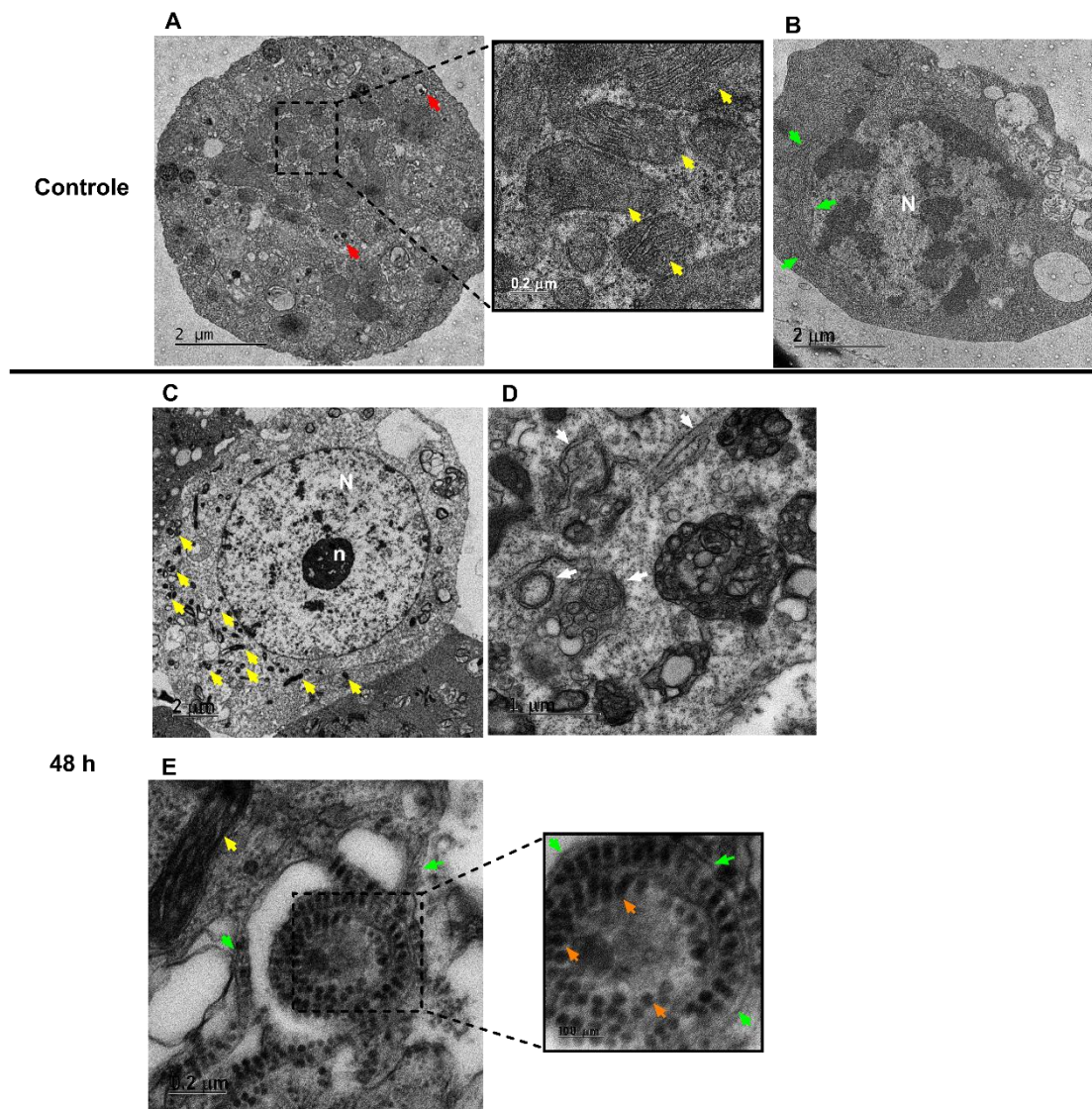


Figura 23. Micrografias eletrônicas de células C6/36 não infectadas (**A**, **B**) e infectadas com CHIKV MOI=0,1 incubado por 48h (**C–E**). **A**) e **B**) Células não infectadas mostrando as mitocôndrias (setas amarelas), vesículas autofágicas (setas vermelhas), possível retículo endoplasmático (seta verde) e o núcleo (N). **C**) e **D**) Células infectadas apresentando citoplasma e núcleo pouco eletrodensos, além de alta produção de mitocôndrias (setas amarelas) e estruturas semelhantes a endossomos (setas brancas). As membranas do núcleo (N) e do nucléolo (n) ainda estão bem preservadas. **E**) Células infectadas mostrando vírions (setas alaranjadas) brotando do retículo endoplasmático (setas verdes) enquanto as mitocôndrias apresentam uma morfologia alongada anormal sugestiva (seta amarela). As barras do controle celular representam 2 μm, 0.2 μm e 2 μm, respectivamente, e as barras de 48 h após infecção representam 2 μm, 1 μm, 2 μm e 100 μm, respectivamente.

3.5 DISCUSSÃO

O CHIKV, responsável pela febre do chikungunya, representa uma grave ameaça à saúde pública global, principalmente nas regiões subtropicais e tropicais, onde

as condições ambientais favorecem sua replicação e a proliferação e a disseminação de seus principais vetores, mosquitos do gênero *Aedes*. Este cenário é agravado pela deficiência em políticas sociais voltadas ao controle vetorial e ao atendimento de surto epidêmicos. A ausência de um tratamento antiviral específico contra a infecção pelo CHIKV tem impulsionado a busca por alternativas terapêuticas, incluindo a investigação de compostos bioativos de origem vegetal com potencial atividade antiviral (Millsapps et al., 2022).

Neste contexto, os estudos *in vitro* com compostos antivirais desempenham um papel fundamental na avaliação preliminar da segurança, eficácia e do mecanismo de ação dessas substâncias antes de sua aplicação em modelos animais e testes clínicos. A utilização de sistemas de cultura celular que permitam a replicação completa do vírus possibilita uma análise detalhada da atividade antiviral, incluindo a determinação da magnitude da inibição, a identificação das fases do ciclo viral afetadas e a avaliação da citotoxicidade em células de vertebrados (Rodriguez et al., 2019).

O crescente interesse no uso de extratos vegetais para identificação de substâncias com atividade antimicrobiana, especialmente contra vírus, destaca um campo promissor na busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, os estudos *in vitro* sobre o efeito antiviral são essenciais, pois permitem determinar concentrações seguras e eficazes antes das realizações de testes *in vivo* e ensaios clínicos, possibilitando uma avaliação mais precisa da relação do risco-benefício (Kagan & Flythe, 2014; Ahmed et al., 2016).

No presente estudo, avaliamos a atividade anti-CHIKV de extratos brutos aquosos de *Eugenia dysenterica* (ED), *Erythroxylum suberosum* (ES), *Miconia chamissois* (MC), e *Sapindus saponaria* (SS), além do extrato etanólico de *Morus nigra* (MN), com o objetivo de realizar o fracionamento guiado por ensaios biológicos para o isolamento de moléculas com atividade antiviral. Uma etapa crucial na investigação de fitoquímicos com potencial terapêutico é a avaliação de sua toxicidade, considerando que a fração, subfração e/ou molécula isolada deve apresentar atividade antiviral sem causar efeitos citotóxicos significativos às células hospedeiras. Assim, a primeira etapa da triagem antiviral consiste na análise da citotoxicidade da substância em estudo, garantindo que sua ação antiviral seja seletiva e segura (Bilir et al., 2018).

Inicialmente, a citotoxicidade de todos os extratos brutos foi avaliada em células Vero por um período de 48 horas, utilizando o ensaio de captação do vermelho neutro (VN). Os resultados revelaram variações significativas nos efeitos citotóxicos, conforme

demonstrados pelos valores de CC_{50} . Todos os extratos mantiveram 100% de viabilidade celular na concentração de 0,310 mg/mL. No entanto, com o aumento da concentração os extratos de ED e ES apresentaram efeitos citotóxicos evidentes, caracterizados por valores de CC_{50} mais baixos. Esses extratos exibiram maior citotoxicidade em concentrações elevadas, com danos celulares, lise e formação de vacúolos, observados a partir de 1,25 mg/mL. Em contraste, os extratos de MC e MN demonstraram menor citotoxicidade, mantendo viabilidade celular superior a 100% até a concentração máxima testada de 2,5 mg/mL, sugerindo um perfil de segurança mais favorável. Já o extrato de SS apresentou citotoxicidade moderada, com um valor de CC_{50} de 37,13 mg/mL, indicando um perfil menos tóxico em comparação com ED e ES.

Chan et al. (2015) compararam a citotoxicidade de seis plantas medicinais (*Acmella ciliata*, *Amaranthus tricolor*, *Coriandrum sativum*, *Glebionis coronaria*, *Kyllinga brevifolia* e *Tradescantia zebrina*) por meio dos ensaios de azul de tetrazólio (MTT) e de VN. Os extratos foram obtidos utilizando diferentes solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e água) e testados em células Vero. Os resultados mostraram que os extratos apolares (hexano, clorofórmio e acetato de etila) foram mais tóxicos que os extratos polares (etanol, metanol e água). Exatamente 37% e 75% dos extratos apresentaram citotoxicidade significativa nos ensaios MTT e VN, respectivamente. Além disso, o estudo revelou que o ensaio MTT subestimou a citotoxicidade em relação ao VN, com nove extratos apresentando concentrações citotóxicas significativamente menores quando avaliados pelo ensaio de VN. Esses achados indicam que a citotoxicidade dos extratos das plantas testadas foi dependente tanto da concentração quanto do solvente utilizado na extração. Além do mais, o ensaio de VN demonstrou maior sensibilidade e confiabilidade na avaliação da viabilidade celular.

A análise da atividade antiviral dos extratos brutos demonstrou que apenas os extratos ED e ES apresentaram atividade significativa anti-CHIKV, destacando seu potencial na busca por novos compostos antivirais. Os testes realizados em diferentes etapas de tratamento (pós-tratamento, co-tratamento e pré-tratamento) revelaram que ambos os extratos reduziram a formação de placas de lise do CHIKV. O extrato ES foi mais eficaz no co-tratamento, reduzindo a formação de placas em até 70% na concentração de 40 µg/mL, enquanto o extrato ED apresentou uma redução de até 70,5% na concentração de 80 µg/mL. A determinação das IC_{50} na etapa de pós-tratamento

indicou que ambos os extratos possuem um efeito antiviral considerável, com valores de IC_{50} de 64,42 $\mu\text{g/mL}$ para ED e 65,64 $\mu\text{g/mL}$ para ES.

No entanto, os resultados também indicaram que a eficácia do extrato ES está diretamente relacionada ao momento de sua aplicação, sendo mais eficaz quando administrado após ou durante a infecção viral, mas não antes dela. Por outro lado, o extrato ED demonstrou um efeito antiviral mais amplo, com uma redução de até 85% na etapa de pré-tratamento e 59% no co-tratamento. O IS mais alto de ED nas etapas de pós e pré-tratamento sugere que esse extrato contém compostos antivirais com um perfil de segurança superior em comparação com ao extrato ES. No entanto, na estratégia de co-tratamento, o extrato ES apresentou um IS excepcionalmente alto (>920), indicando que, apesar de sua maior citotoxicidade, ele possui um grande potencial para investigação de moléculas antivirais devido à sua alta eficácia na redução da replicação viral. Diante desses resultados promissores e do alto IS observado, realizamos o fracionamento dos extratos ED e ES com o objetivo de identificar quais frações apresentariam maior atividade antiviral por meio de ensaios bio-guiados.

A técnica de fracionamento guiado por ensaios biológicos tem como finalidade a identificação e isolamento de compostos bioativos presentes em espécies vegetais. No contexto atual da descoberta de novos fármacos, a diversidade química encontrada nas plantas representa um potencial significativo. No entanto, para que esses compostos possam ser devidamente explorados, é essencial o uso de métodos padronizados e rigorosos para seu isolamento e avaliação, garantindo a eficácia e segurança de futuros agentes antivirais.

Esse método se destaca por sua capacidade de combinar o poder de triagem biológica com a precisão das técnicas cromatográficas, permitindo a separação e purificação de compostos bioativos. Isso facilita a identificação de substâncias que demonstram atividades terapêuticas específicas, como propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias ou anticancerígenas. Uma das principais vantagens do fracionamento por ensaio bio-guiado é sua robustez na detecção de compostos ativos em uma ampla diversidade de extratos vegetais, sem a necessidade de um conhecimento prévio sobre quais substâncias são responsáveis pela atividade biológica observada (Mani et al. 2022).

No entanto, embora o fracionamento por ensaio bio-guiado seja eficiente, esse método ainda enfrenta desafios significativos. A complexidade das matrizes vegetais, a variabilidade entre espécies e até mesmo entre amostras da mesma espécie podem comprometer a reprodutibilidade dos resultados, dificultando o desenvolvimento de uma

abordagem padronizada aplicável a todas as plantas. Além disso, a integração entre as etapas de fracionamento e os bioensaios *in vitro* exige um controle rigoroso das condições experimentais, o que pode demandar recursos técnicos e financeiros consideráveis. Por outro lado, o fracionamento guiado por ensaios biológicos proporciona uma análise aprofundada das propriedades bioativas dos extratos vegetais, permitindo o isolamento de compostos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos (Weller, 2012; Dettweiler et al. 2020).

Nossos resultados da extração sólido-líquido dos extratos brutos ED e ES, juntamente com a análise das frações obtidas, forneceram *insights* importantes sobre a atividade antiviral e o perfil farmacognóstico desses extratos. O processo de extração permitiu a separação das frações solúveis (EDE2 e ESE2) e insolúveis (EDE3 e ESE3), com rendimentos de 70% e 30%, respectivamente. A separação e posterior evaporação do metanol foram eficazes, e as frações solúveis demonstraram compatibilidade com DMSO, garantindo condições adequadas para os testes posteriores de citotoxicidade e atividade antiviral.

O fracionamento cromatográfico, realizado por cromatografia de coluna (CC) e de camada delgada (CCD), permitiu a identificação de compostos bioativos nas frações solúveis e insolúveis, incluindo ácidos fenólicos, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e antivirais. Em relação à citotoxicidade, as frações EDE2, EDE3, ESE2 e ESE3 não apresentaram toxicidade significativa em células Vero, mantendo viabilidade celular superior a 90% na concentração de 50 µg/mL. Esses resultados sugerem que as frações são seguras para uso em ensaios antivirais, uma característica essencial para garantir a validade dos testes e reforçar seu potencial terapêutico. Quanto à atividade antiviral, as frações solúveis (EDE2 e ESE2) demonstraram alta eficácia na etapa de co-tratamento, com a fração ESE2 reduzindo em até 99,14% a formação de placas de lise com apenas 1 µg/mL. Em contraste, as frações insolúveis (EDE3 e ESE3) não apresentaram atividade antiviral significativa, sugerindo que os compostos bioativos com ação antiviral estão predominantemente presentes nas frações solúveis.

Diante dos resultados obtidos, optamos por avançar para um segundo fracionamento, focado exclusivamente na fração de ESE2. Esse processo permitiu o isolamento de cinco subfrações (ESE2F1-5), que foram subsequentemente avaliadas quanto à citotoxicidade e à atividade antiviral na etapa de co-tratamento. A análise de citotoxicidade revelou que todas as subfrações apresentaram um perfil de segurança favorável, mantendo viabilidade celular superior a 86% na concentração de 0,5 µg/mL.

Esses resultados reforçam o potencial terapêutico das subfrações e indicam a possibilidade de identificação de compostos ativos responsáveis pela atividade antiviral observada. Entre as subfrações, ESE2F1 e ESE2F3 se destacaram por sua potente atividade antiviral. No entanto, a análise cromatográfica da subfração ESE2F1 revelou a presença de um número reduzido de moléculas em comparação com ESE2F3. Com base nesses dados, optou-se por realizar a purificação de ESE2F1, visando o isolamento e a obtenção da molécula ativa em sua forma pura para caracterização estrutural e estudos adicionais.

Os resultados obtidos a partir da purificação das moléculas presentes na subfração ESE2F1 mostraram um potencial promissor tanto para a atividade anti-CHIKV quanto para a viabilidade celular. A cromatografia em coluna mostrou-se eficiente na separação das frações majoritárias, que apresentaram perfis cromatográficos distintos, destacando dois picos predominantes, denominados ESE2F1-A e ESE2F1-D. Essas moléculas foram selecionadas para estudos *in vitro* subsequentes. Os ensaios de atividade antiviral contra CHIKV apresentaram resultados promissores, especialmente para a molécula ESE2F1-A, que demonstrou alta atividade antiviral aliada a baixa citotoxicidade. A análise revelou que essa molécula reduziu a formação de placas de lise em até 72,97% na concentração de 1000 µg/mL. Em comparação, a molécula ESE2F1-D também apresentou atividade antiviral, mas menos expressiva, com uma redução de apenas 47,6% nas placas de lise, particularmente em concentrações mais elevadas, onde sua eficácia antiviral mostrou-se reduzida. Esses achados sugerem que a molécula ESE2F1-A pode ser mais eficaz na inibição da replicação viral, o que está em concordância com seu perfil menos citotóxico. Contudo, ambas as moléculas mantiveram viabilidade celular superior a 80% nas concentrações terapêuticas testadas, reforçando seu potencial para estudos futuros no desenvolvimento de novos agentes antivirais.

Ao observarmos a autofluorescência dessas moléculas a 356nm, optamos por realizar microscopia confocal para visualizar sua possível localização celular. Os ensaios indicaram que tanto ESE2F1-A quanto ESE2F1-D podem ser internalizadas pelas células. Embora o mecanismo de entrada e de ação antiviral dessas moléculas ainda seja desconhecido, sugerimos que elas possam interferir nos estágios iniciais da replicação viral. Uma hipótese é que essas moléculas interajam com os endossomos formados durante a internalização do CHIKV por endocitose, potencialmente bloqueando a liberação do RNA viral no citoplasma e, conseqüentemente, inibindo a replicação viral. Esse mecanismo de ação seria semelhante ao de antivirais que atuam na fase inicial do

ciclo celular, impedindo a progressão da infecção. O desenvolvimento de estratégias para fármacos antivirais geralmente segue duas abordagens principais: a atuação direta sobre o vírus ou a modulação de fatores da célula hospedeira. Os antivirais direcionados ao vírus incluem inibidores da adsorção e descapsidação viral, além de inibidores de polimerases, proteases, nucleosídeos, transcriptases reversa e de integrases (Leyssen et al. 2008; Kausar et al. 2021).

Determinados compostos bioativos de origem vegetal desempenham um papel fundamental na regeneração, diferenciação e imunomodulação tecidual. Estudos indicam que esses compostos atuam como mediadores bioativos na regulação da divisão e diferenciação celular, modulando vias de sinalização complexas, incluindo genes codificadores de proteínas essenciais para o crescimento, migração e diferenciação celular. Portanto, o uso de fitoquímicos bioativos apresenta um potencial promissor no tratamento de diversas condições patológicas, como osteoporose, distúrbios neurodegenerativos e outras condições degenerativas dos tecidos (Saud et al. 2019). Diante disso, os ensaios de fluorescência revelaram que células tratadas com a 1000 ng/mL de cada molécula apresentaram estruturas celulares sugestivas da fase de divisão celular – anáfase. Esses achados sugerem que as moléculas testadas podem interferir em processos celulares, possivelmente induzindo um aumento na taxa de multiplicação celular em comparação ao grupo controle. Esses resultados reforçam a necessidade de investigações adicionais para compreender melhor os mecanismos de ação envolvidos e avaliar seu potencial terapêutico em diferentes contextos biológicos.

3.6 CONCLUSÃO

A combinação de fracionamento e bioensaio representa uma abordagem promissora para a descoberta de novos fármacos de origem vegetal. Contudo, para que esse potencial seja totalmente explorado, é fundamental continuar investindo no aprimoramento das técnicas de fracionamento e na padronização dos métodos de avaliação biológica, garantindo a reprodutibilidade dos resultados e a eficácia dos compostos isolados. Os achados deste estudo demonstraram que as moléculas isoladas das subfrações ESE2F1, especialmente ESE2F1-A, apresentam grande potencial terapêutico contra o CHIKV, devido à combinação de alta atividade antiviral e baixa citotoxicidade. A continuidade das investigações, incluindo a elucidação estrutural e caracterização dessas moléculas, será essencial para confirmar sua eficácia e aplicabilidade terapêutica no combate ao CHIKV. Além disso, esses estudos podem contribuir para o

desenvolvimento de novas estratégias antivirais, preenchendo lacunas no tratamento de infecções virais emergentes.

3.7 REFERÊNCIAS

Aamir, U. B., Badar, N., Salman, M., Ahmed, M., & Alam, M. M. (2017). Outbreaks of chikungunya in Pakistan. *The Lancet Infectious diseases*, 17(5), 483.

Abd El-Hafiz, M. A., Weniger, B., Quirion, J. C., & Anton, R. (1991). Ketoalcohols, lignans and coumarins from *Chiococca alba*. *Phytochemistry*, 30(6), 2029-2031.

Abdel Wahab, S. M., & Selim, M. A. (1985). Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*. *Fitoterapia*.

Abookleesh, F. L., Al-Anzi, B. S., & Ullah, A. (2022). Potential antiviral action of alkaloids. *Molecules*, 27(3), 903.

Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat?. *Emerging microbes & infections*, 7(1), 1-11.

Adamczak, A., Ożarowski, M., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 109.

Ahmed, S. I., Hayat, M. Q., Tahir, M., Mansoor, Q., Ismail, M., Keck, K., & Bates, R. B. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 1-9.

Albiero, A. L. M., Bacchi, E. M., & Mourão, K. S. M. (2001). Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L.(Sapindaceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 23, 549-560.

Alseekh, S., de Souza, L. P., Benina, M., & Fernie, A. R. (2020). The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. *Phytochemistry*, 174, 112347.

Alves, N. R. (2016). *Estudo dos extratos de três espécies do gênero Miconia sobre a inibição das MMPs 2 e 9 e sobre o crescimento tumoral in vitro* (Doctoral dissertation, Universidade Federal de São João Del-Rei). Acesso em 03/01/2023.

Amaral, J. K., Bilsborrow, J. B., & Schoen, R. T. (2020). Chronic Chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis: what they have in common. *The American journal of medicine*, 133(3), e91-e97.

Américo, Á. V. L. D. S., Nunes, K. M., Assis, F. F. V. D., Dias, S. R., Passos, C. T. S., Morini, A. C., ... & Minervino, A. H. H. (2020). Efficacy of phytopharmaceuticals from the Amazonian plant *Libidibia ferrea* for wound healing in dogs. *Frontiers in veterinary science*, 7, 244.

Amir, M., Mujeeb, M., Ahmad, S., Akhtar, M., & Ashraf, K. (2013). Design expert-supported development and validation of HPTLC method: an application in simultaneous estimation of quercetin and rutin in *Punica granatum*, *Tamarindus indica* and *Prunus domestica*. *Pharmaceutical Methods*, 4(2), 62-67.

Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of Vero cell lines. *Current protocols in microbiology*, 11(1), A-4E.

Anderson, C. B., Downs, W. G., Wattlby, G. H., Ahin, N. W., & Beesb, A. A. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, BWI. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6).

Aslam, K., Khosa, M. K., Jahan, N., & Nosheen, S. (2010). Short communication: synthesis and applications of Coumarin. *Pak. J. Pharm. Sci*, 23(4), 449-454.

Auguste, A. J., Liria, J., Forrester, N. L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K. C., ... & Weaver, S. C. (2015). Evolutionary and ecological characterization of Mayaro virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1742.

Azevedo, R. S., Silva, E. V., Carvalho, V. L., Rodrigues, S. G., Neto, J. P. N., Monteiro, H. A., ... & Vasconcelos, P. F. (2009). Mayaro fever virus, Brazilian amazon. *Emerging infectious diseases*, 15(11), 1830.

Babaeimarzangou, S. S., Zaker, H., Soleimannezhadbari, E., Gamchi, N. S., Kazemina, M., Tarighi, S., ... & Margina, D. (2023). Vaccine development for zoonotic viral diseases caused by positive-sense single-stranded RNA viruses belonging to the Coronaviridae and Togaviridae families. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 25(1), 1-24.

Badshah, S. L., Faisal, S., Muhammad, A., Poulson, B. G., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2021). Antiviral activities of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 140, 111596.

Barbosa, W. L. R., & Pinto, L. D. N. (2003). Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A'Ukre e Pykanu-sudeste do Pará. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 47-49.

Barbosa, W. L. R., Oliveira, W. P., da Silva, A. S. B., & Pinheiro, A. C. (2022). Registration of Phytomedicines: Technical Requirements and Highlights on Regulation Instruments. In *Phytotechnology* (pp. 309-325). CRC Press.

Barkat, M. A., Goyal, A., Barkat, H. A., Salauddin, M., Pottoo, F. H., & Anwer, E. T. (2021). Herbal Medicine: Clinical Perspective and Regulatory Status. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 24(10), 1573-1582.

Barreto, C. F., Carvasin, G. M., Silva, H. H. G. D., & Silva, I. G. D. (2006). Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (Sapindaceae).

Barros, I. M. D. C., Leite, B. H., Leite, C. F., Fagg, C. W., Gomes, S. M., Resck, I. S., ... & Silveira, D. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Erythroxylum suberosum* A. St. Hil. leaves. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(03), 088-094.

Berhanemeskel, W. (2009). Review on the importance of documenting ethnopharmacological information on medicinal plants. *African journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(9), 400-403.

Bernard, E., Solignat, M., Gay, B., Chazal, N., Higgs, S., Devaux, C., & Briant, L. (2010). Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PloS one*, 5(7), e11479.

Bhardwaj, S., Verma, R., & Gupta, J. (2018). Challenges and future prospects of herbal medicine. *International Research in Medical and Health Sciences*, 1(1), 12-15.

Bhattacharjee, R., Kumar, L., Mukerjee, N., Anand, U., Dhasmana, A., Preetam, S., ... & Proćków, J. (2022). The emergence of metal oxide nanoparticles (NPs) as a phytomedicine: A two-facet role in plant growth, nano-toxicity and anti-phyto-microbial activity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 155, 113658.

Bilir, E. K., Tutun, H., Sevin, S., KISMALI, G., & Yarsan, E. (2018). Cytotoxic effects of *Rhododendron ponticum* L. extract on prostate carcinoma and adenocarcinoma cell line (DU145, PC3). *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(3).

Blitvich, B. (2016). Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2), 488.

Blohm, G., Elbadry, M. A., Mavian, C., Stephenson, C., Loeb, J., White, S., ... & Morris Jr, J. G. (2019). Mayaro as a Caribbean traveler: Evidence for multiple introductions and transmission of the virus into Haiti. *International Journal of Infectious Diseases*, 87, 151-153.

Bolzani, V. D. S., Young, M. C. M., Furlan, M., Cavalheiro, A. J., Araujo, A. R., & Silva, D. H. S. (2001). Secondary metabolites from Brazilian Rubiaceae plant species:

Chemotaxonomical and biological significance. *Recent research developments in phytochemistry*, 19-31.

Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), 119-124.

Borges, R. M., Tinoco, L. W., Souza Filho, J. D. D., Barbi, N. D. S., & Silva, A. J. R. D. (2009). Two new oleanane saponins from *Chiococca alba* (L.) Hitch. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 1738-1741.

Borges-Argáez, R., Medina-Baizabál, L., May-Pat, F., Waterman, P. G., & Peña-Rodríguez, L. M. (2001). Merilactone, an Unusual C19 Metabolite from the Root Extract of *Chiococca alba*. *Journal of Natural Products*, 64(2), 228-231.

Braga, F. C., & Côrtes, S. F. (2019). Herbal Products in Antihypertensive Therapy: Potentialities and Challenges—A Brazilian Perspective. In *Natural Medicines* (pp. 313-332). CRC Press.

Brasil, Ministério da Saúde. Monitoramento das arboviroses e balanço de encerramento do Comitê de Operações de Emergência (COE) Dengue e outras Arboviroses 2024. **Boletim epidemiológico**, Brasília, v. 55, n. 11. 04 de julho, 2024. Acesso em: 11 de dezembro de 2024.

Brasil. Resolução RCD nº 1,6 de 13 de maio de 2014. Aprova o “**Registro de medicamentos fitoterápicos e o registo e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: Acesso em: 26 de dezembro de 2022.

Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014). Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 87, 218-228.

Buerger, V., Hadl, S., Schneider, M., Schaden, M., Hochreiter, R., Bitzer, A., ... & Jaramillo, J. C. (2025). Safety and immunogenicity of a live-attenuated chikungunya virus vaccine in endemic areas of Brazil: interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial in adolescents. *The Lancet Infectious Diseases*, 25(1), 114-125.

Cai, L., Hu, X., Liu, S., Wang, L., Lu, H., Tu, H., ... & Tong, Y. (2023). The research progress of Chikungunya fever. *Frontiers in Public Health*, 10, 1095549.

Calisher, C. H., & Monath, T. P. (1988). Togaviridae and flaviviridae: The alphaviruses and flaviviruses. In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice* (pp. 414-434). Springer, New York, NY.

Calixto, J. B. (2019). The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.

Carbonezi, C. A., Martins, D., Young, M. C. M., Lopes, M. N., Furlan, M., Rodrigues Filho, E., & da S Bolzani, V. (1999). Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chiococca alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 51(6), 781-785.

Carletti, G., Nervo, G., & Cattivelli, L. (2014). Flavonoids and melanins: a common strategy across two kingdoms. *International Journal of Biological Sciences*, 10(10), 1159.

Cassino, R. F., Martinho, C. T., & da Silva Caminha, S. A. (2015). Modern pollen spectra of the Cerrado vegetation in two national parks of Central Brazil, and implications for interpreting fossil pollen records. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 223, 71-86.

Castro, O., Gutiérrez, J. M., Barrios, M., Castro, I., Romero, M., & Umaña, E. (1999). Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Revista de biología tropical*, 47(3), 605-616.

Causey, O. R., & Maeoja, O. M. (1957). Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6(6).

Cecílio, A. B., de Faria, D. B., de Carvalho Oliveira, P., Caldas, S., de Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G., ... & de Almeida, V. L. (2012). Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of ethnopharmacology*, 141(3), 975-981.

CEPLAMT. Centro Especializado Em Plantas Aromáticas, Medicinais e Tóxicas: Cainca, cipó-cruz, quina preta, raiz preta (raízes). Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Santa Inês – MG, 2016. Disponível em: <<http://www.ceplamt.org.br/bancodeamostras/cainca/>> Acesso em 26/01/2023.

Chan, S. M., Khoo, K. S., & Sit, N. W. (2015). Interactions between plant extracts and cell viability indicators during cytotoxicity testing: implications for ethnopharmacological studies. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(11), 1991-1998.

Chase, C. C. (2022). Togaviridae and Flaviviridae. *Veterinary Microbiology*, 552-572.
Chaves, M. H. (1997). Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". *Química Nova*, 20, 560-562. doi: 10.1590/s0100-40421997000500019.

Chen, H., Pu, J., Liu, D., Yu, W., Shao, Y., Yang, G., ... & He, N. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.). *PloS one*, 11(4), e0153080.

Chen, Q., Wang, D., Tan, C., Hu, Y., Sundararajan, B., & Zhou, Z. (2020). Profiling of flavonoid and antioxidant activity of fruit tissues from 27 Chinese local citrus cultivars. *Plants*, 9(2), 196.

Chevillon, C., Briant, L., Renaud, F., & Devaux, C. (2008). The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends in microbiology*, 16(2), 80-88.

Chojnacka, K., Skrzypczak, D., Izydorczyk, G., Mikula, K., Szopa, D., & Witek-Krowiak, A. (2021). Antiviral properties of polyphenols from plants. *Foods*, 10(10), 2277.

Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G. J., & Reusken, C. (2012). Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 55(3), 191-203.

Cory, J., Yunker, C. E., Ormsbee, R. A., Peacock, M., Meibos, H., & Tallent, G. (1974). Plaque assay of rickettsiae in a mammalian cell line. *Applied microbiology*, 27(6), 1157-1161.

Cruz, J. "Cainca". Estudo Botânico Farmacognóstico e Químico. Boletim do Museu Nacional, 7: 97-116, 1932.

da Cruz, J. E. R., Saldanha, H. C., e Freitas, G. R. O., & Morais, E. R. (2022). A review of medicinal plants used in the Brazilian Cerrado for the treatment of fungal and bacterial infections. *Journal of Herbal Medicine*, 31, 100523.

da Silva Vargem, D., da Silva Braz, V., de Oliveira Lemes, E., & de Castro Peixoto, J. (2022). Plantas medicinais do cerrado: estudos etnobotânicos e etnofarmacológico. *Research, Society and Development*, 11(10), e595111033149-e595111033149.

De Curtis, I., & Simons, K. (1988). Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(21), 8052-8056.

de Góes Cavalcanti, L. P., Siqueira, A. M., de Sousa Moreira, J. A., & Freitas, A. R. R. (2022). Chikungunya. In *Infectious Tropical Diseases and One Health in Latin America* (pp. 19-36). Springer, Cham.

de Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R. N., Tsetsarkin, K., Higgs, S., & Gould, E. A. (2008). Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come?. *Virology journal*, 5(1), 1-4.

de Lima Cavalcanti, T. Y. V., Pereira, M. R., de Paula, S. O., & Franca, R. F. D. O. (2022). A review on chikungunya virus epidemiology, pathogenesis and current vaccine development. *Viruses*, 14(5), 969.

DeFilippis, V. R. (2019). Chikungunya virus vaccines: platforms, progress, and challenges. *Chikungunya Virus*, 81-106.

Dettweiler, M., Marquez, L., Bao, M., & Quave, C. L. (2020). Quantifying synergy in the bioassay-guided fractionation of natural product extracts. *PLoS One*, 15(8), e0235723.

Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377.

Donado-Pestana, C. M., Moura, M. H. C., de Araujo, R. L., de Lima Santiago, G., de Moraes Barros, H. R., & Genovese, M. I. (2018). Polyphenols from Brazilian native Myrtaceae fruits and their potential health benefits against obesity and its associated complications. *Current opinion in food science*, 19, 42-49.

Duarte, A. R., Naves, R. R., Santos, S. C., Seraphin, J. C., & Ferri, P. H. (2009). Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 967-974.

El Abbadi, N., Weniger, B., Lobstein, A., Quirion, J. C., & Anton, R. (1989). New alkaloids of *Chiococca alba*. *Planta Medica*, 55(07), 603-604.

Elias, S. T., Borges, G. A., Amorim, D. A., Rêgo, D. F., Simeoni, L. A., Silveira, D., ... & Guerra, E. N. (2015). Radiation induced a supra-additive cytotoxic effect in head and neck carcinoma cell lines when combined with plant extracts from Brazilian Cerrado biome. *Clinical oral investigations*, 19, 637-646.

Erasmus, J. H., Rossi, S. L., & Weaver, S. C. (2016). Development of vaccines for chikungunya fever. *The Journal of infectious diseases*, 214(suppl_5), S488-S496.

Fernández-Salas, I., Díaz-González, E. E., López-Gatell, H., & Alpuche-Aranda, C. (2016). Chikugunya and zika virus dissemination in the Americas: different arboviruses reflecting the same spreading routes and poor vector-control policies. *Current opinion in infectious diseases*, 29(5), 467-475.

Ferreira T. P, Kuckelhaus I. G. P, Tschoeke P. H, Cangussu A. S, Borges J. C. M, de Souza Moura W, et al (2017). Influence of seasonality on the yield and composition of the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. *African Journal of Biotechnology*, 16(29), 1611-1618.

Ferreira, A. R., Alves, D. D. N., de Castro, R. D., Perez-Castillo, Y., & de Sousa, D. P. (2022). Synthesis of coumarin and homoisoflavonoid derivatives and analogs: The search for new antifungal agents. *Pharmaceuticals*, 15(6), 712.

Ferreira, J. D. F., López, M. H. M., Gomes, J. V. D., Martins, D. H. N., Fagg, C. W., Magalhães, P. O., ... & Fonseca-Bazzo, Y. M. (2022). Seasonal chemical evaluation of *Miconia chamissois* Naudin from Brazilian savanna. *Molecules*, 27(3), 1120.

Firth, A. E., Chung, B. Y., Fleeton, M. N., & Atkins, J. F. (2008). Discovery of frameshifting in *Alphavirus* 6K resolves a 20-year enigma. *Virology journal*, 5(1), 1-19.

Floc'h, F., Mauger, F., Desmurs, J. R., Gard, A., Bagneris, F., & Carlton, B. (2002). Coumarin in plants and fruits: implications in perfumery. *Perfum. Flavor*, 27(2), 32-36.

Fokunang, E. T., Fonmboh, D. J., Mballa, R. N., Nyuyki, A. B., Fokunang, L. B., Kaba, N., ... & Fokunang, C. N. (2020). Pharmacovigilance of Natural Herbal Medicines Research for Efficacy, Safety and Quality Assurance of Phytomedicine Products. *J. Complement. Altern. Med. Res*, 21-37.

Franz, A. W., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., & Clem, R. J. (2015). Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses*, 7(7), 3741-3767.

Freire, M. C., Basso, L. G., Mendes, L. F., Mesquita, N. C., Mottin, M., Fernandes, R. S., ... & Oliva, G. (2022). Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase from Chikungunya virus and discovery of a novel ligand as a potential drug candidate. *Scientific reports*, 12(1), 10601.

Freitas, M. M., Fontes, P. R., Souza, P. M., William Fagg, C., Neves Silva Guerra, E., de Medeiros Nóbrega, Y. K., ... & Oliveira Magalhães, P. (2016). Extracts of *Morus nigra* L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PloS one*, 11(9), e0163130.

Ganai, S. A., Sheikh, F. A., Baba, Z. A., Mir, M. A., Mantoo, M. A., & Yattoo, M. A. (2021). Anticancer activity of the plant flavonoid luteolin against preclinical models of various cancers and insights on different signalling mechanisms modulated. *Phytotherapy Research*.

Gao, S., Song, S., & Zhang, L. (2019). Recent progress in vaccine development against chikungunya virus. *Frontiers in microbiology*, 10, 2881.

Gasca, C. A., Dassoler, M., Brand, G. D., de Medeiros Nóbrega, Y. K., Gomes, S. M., Jamal, C. M., ... & Silveira, D. (2020). Chemical composition and antifungal effect of ethanol extract from *Sapindus saponaria* L. fruit against banana anthracnose. *Scientia Horticulturae*, 259, 108842.

Gazda, V. E. Abordagem Química e Estudo da Atividade Biológica das Raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae). 2004. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia.

- Gazda, V. E., Gomes-Carneiro, M. R., Barbi, N. S., & Paumgarten, F. J. (2006). Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *Journal of ethnopharmacology*, 105(1-2), 187-195.
- Ghildiyal, R., Prakash, V., Chaudhary, V. K., Gupta, V., & Gabrani, R. (2020). Phytochemicals as antiviral agents: recent updates. In *Plant-derived bioactives* (pp. 279-295). Springer, Singapore.
- Girard, M., Nelson, C. B., Picot, V., & Gubler, D. J. (2020). Arboviruses: A global public health threat. *Vaccine*, 38(24), 3989-3994.
- Glomb-Reinmund, S., & Kielian, M. (1998). The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus. *Virology*, 248(2), 372-381.
- Goh, V. S. L., Mok, C. K., & Chu, J. J. H. (2020). Antiviral natural products for arbovirus infections. *Molecules*, 25(12), 2796.
- Gomes, L. F., Martins, D. H. N., da Silva, S. M. M., de Barros, Y. Y., de Souza, P. M., de Freitas, M. M., ... & Bazzo, Y. M. F. (2021). Propiedades biológicas y caracterización fitoquímica del extracto acuoso de *Miconia chamissois* Naudin. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 20(4), 427-442.
- Guarim Neto, G., & Morais, R. G. D. (2003). Medicinal plants resources in the Cerrado of Mato Grosso State, Brazil: a review. *Acta Botanica Brasilica*, 17, 561-584.
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of medical research*, 33(4), 330-342.
- Gusmão, E. D. D., Souza, J. P. D., Silva, I. M. D. S., & Silva, L. B. D. (1992). Estudo anátomo-morfológico de dicotiledôneas das dunas de Salvador-Bahia: *Borreria cymosa* Cham. et Schl. e *Chiococca brachiata* R. et P.(Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 6, 79-98.
- Guth, S., Hanley, K. A., Althouse, B. M., & Boots, M. (2020). Ecological processes underlying the emergence of novel enzootic cycles: Arboviruses in the neotropics as a case study. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(8), e0008338.
- Halstead, S. B. (2015). Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. *Emerging infectious diseases*, 21(4), 557.
- Hanley, K. A., & Weaver, S. C. (2008). Arbovirus evolution. In *Origin and evolution of viruses* (pp. 351-391). Academic Press.

Hashimoto, K., Erdei, S., Keränen, S., Saraste, J., & Kääriäinen, L. (1981). Evidence for a separate signal sequence for the carboxy-terminal envelope glycoprotein E1 of Semliki Forest virus. *Journal of Virology*, 38(1), 34-40.

Hoensch, H. P., & Weigmann, B. (2018). Regulation of the intestinal immune system by flavonoids and its utility in chronic inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 24(8), 877.

Hofmann, G. S., Cardoso, M. F., Alves, R. J., Weber, E. J., Barbosa, A. A., de Toledo, P. M., ... & de Oliveira, L. F. (2021). The Brazilian Cerrado is becoming hotter and drier. *Global Change Biology*, 27(17), 4060-4073.

Honório, N. A., Wiggins, K., Câmara, D. C. P., Eastmond, B., & Alto, B. W. (2018). Chikungunya virus vector competency of Brazilian and Florida mosquito vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(6), e0006521.

Hosseinzade, A., Sadeghi, O., Naghdipour Biregani, A., Soukhtehzari, S., Brandt, G. S., & Esmailzadeh, A. (2019). Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD4⁺ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Frontiers in immunology*, 10, 51.

Huang, Y. J. S., Higgs, S., & Vanlandingham, D. L. (2019). Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Frontiers in microbiology*, 10, 22.

Hwu, J. R., Huang, W. C., Lin, S. Y., Tan, K. T., Hu, Y. C., Shieh, F. K., ... & Tsay, S. C. (2019). Chikungunya virus inhibition by synthetic coumarin-guanosine conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 166, 136-143.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <https://ictv.global/taxonomy/>. Acesso em 20 de março de 2025.

Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 46, 273-307.

Iranpour, M., Moghadam, A. R., Yazdi, M., Ande, S. R., Alizadeh, J., Wiechec, E., ... & Ghavami, S. (2016). Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert reviews in molecular medicine*, 18.

Jain, J., Kaur, N., Haller, S. L., Kumar, A., Rossi, S. L., Narayanan, V., ... & Sunil, S. (2020). Chikungunya outbreaks in India: a prospective study comparing neutralization and sequelae during two outbreaks in 2010 and 2016. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(4), 857.

Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, & Kim, K. M. (2021). Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy*, 11(5), 968.

Jiang, Y., & Nie, W. J. (2015). Chemical properties in fruits of mulberry species from the Xinjiang province of China. *Food Chemistry*, 174, 460-466.

Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. D. S., Barriga, J. R. D. M., Dias, K. C. F., ... & Vasconcelos, S. M. M. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural product research*, 34(5), 692-705.

Kagan, I. A., & Flythe, M. D. (2014). Thin-layer chromatographic (TLC) separations and bioassays of plant extracts to identify antimicrobial compounds. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (85). doi: 10.3791/51411.

Kamrud, K. I., Alterson, K., Custer, M., Dudek, J., Goodman, C., Owens, G., & Smith, J. F. (2010). Development and characterization of promoterless helper RNAs for the production of *Alphavirus* replicon particle. *Journal of General Virology*, 91(7), 1723-1727.

Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 10(4), 1567-1574.

Kaur, N., Kumar, V., Rishi, P., Sehrawat, N., Dilawari, R., Kumar, P., & Aggarwal, N. K. (2019). Phytomedicine: history, scope and future prospects. *Industrial Biotechnology: Plant Systems, Resources and Products*, 105.

Kausar, S., Said Khan, F., Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M., Akram, M., Riaz, M., Rasool, G., ... & Malik, A. (2021). A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 35, 20587384211002621.

Kiani, R., Arzani, A., & Mirmohammady Maibody, S. A. M. (2021). Polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, *Aegilops cylindrica* and their amphidiploids. *Frontiers in Plant Science*, 12, 646221.

Kielian, M., Chanel-Vos, C., & Liao, M. (2010). *Alphavirus* entry and membrane fusion. *Viruses*, 2(4), 796-825.

Kikuchi, H., Yuan, B., Hu, X., & Okazaki, M. (2019). Chemopreventive and anticancer activity of flavonoids and its possibility for clinical use by combining with conventional chemotherapeutic agents. *American journal of cancer research*, 9(8), 1517.

Klimstra, W. B., Heidner, H. W., & Johnston, R. E. (1999). The furin protease cleavage recognition sequence of Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate. *Journal of virology*, 73(8), 6299-6306.

Kraimi, A., Belboukhari, N., Sekkoum, K., & Aboul-Enein, H. Y. (2021). Chiral anticoagulants drugs based on coumarin. *Aditum Journal of Clinical and Biomedical Research*, 2(1).

Kucharz, E. J., & Cebula-Byrska, I. (2012). Chikungunya fever. *European journal of internal medicine*, 23(4), 325-329.

Kuhn, R. J. (2013). Togaviridae. *Fields virology*, 1, 629-650.

Kutchan, T., Gershenzon, J., Moller, B. L., & Gang, D. (2015). Natural products. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Edition (pp. 1132-1206). John Wiley & Sons.

Latrubesse, E. M., Arima, E., Ferreira, M. E., Nogueira, S. H., Wittmann, F., Dias, M. S., ... & Bayer, M. (2019). Fostering water resource governance and conservation in the Brazilian Cerrado biome. *Conservation Science and Practice*, 1(9), e77.

Leite, C. F. M., Leite, B. H. M., de Carvalho Barros, I. M., Gomes, S. M., Fagg, C. W., Simeoni, L. A., ... & Fonseca, Y. M. (2014). Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(2), 135-143.

Leite, P. M., Camargos, L. M., & Castilho, R. O. (2021). Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. *European Journal of Integrative Medicine*, 41, 101270.

Leung, J. Y. S., Ng, M. M. L., & Chu, J. J. H. (2011). Replication of *Alphaviruses*: a review on the entry process of *Alphaviruses* into cells. *Advances in virology*, 2011.

Levi, L. I., & Vignuzzi, M. (2019). Arthritogenic *Alphaviruses*: a worldwide emerging threat?. *Microorganisms*, 7(5), 133.

Leyssen, P., De Clercq, E., & Neyts, J. (2008). Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral research*, 78(1), 9-25.

Li, X. F., Jiang, T., Deng, Y. Q., Zhao, H., Yu, X. D., Ye, Q., ... & Qin, C. F. (2012). Complete genome sequence of a chikungunya virus isolated in Guangdong, China.

Lim, S. Y. M., Chieng, J. Y., & Pan, Y. (2021). Recent insights on anti-dengue virus (DENV) medicinal plants: Review on *in vitro*, *in vivo* and *in silico* discoveries. *All Life*, 14(1), 1-33.

Lima, T. B., Silva, O. N., Silva, L. P., Rocha, T. L., Grossi-de-Sá, M. F., Franco, O. L., & Leonardecz, E. (2010). *In vivo* effects of cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf

extracts on diarrhea treatment. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Long, K. M., & Heise, M. T. (2012). Chikungunya virus transmission—more than meets the eye. *The Journal of infectious diseases*, 206(6), 806-807.

Lum, F. M., & Ng, L. F. (2015). Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral research*, 120, 165-174.

Majinda, R. R. T., Mazimba, O., & Motlhanka, D. (2011). Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*.

Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food chemistry*, 299, 125124.

Mani, J., Johnson, J., Hosking, H., Hoyos, B. E., Walsh, K. B., Neilsen, P., & Naiker, M. (2022). Bioassay guided fractionation protocol for determining novel active compounds in selected Australian flora. *Plants*, 11(21), 2886.

Mardekian, S. K., & Roberts, A. L. (2015). Diagnostic options and challenges for dengue and chikungunya viruses. *BioMed research international*, 2015.

Matusali, G., Colavita, F., Bordi, L., Lalle, E., Ippolito, G., Capobianchi, M. R., & Castilletti, C. (2019). Tropism of the chikungunya virus. *Viruses*, 11(2), 175.

Maure, C., Khazhidinov, K., Kang, H., Auzenberg, M., Moyersoen, P., Abbas, K., ... & Sahastrabudhe, S. (2024). Chikungunya vaccine development, challenges, and pathway toward public health impact. *Vaccine*, 42(26), 126483.

Mavian, C., Rife, B. D., Dollar, J. J., Cella, E., Ciccozzi, M., Prosperi, M. C., ... & Salemi, M. (2017). Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. *Scientific reports*, 7(1), 8718.

McAuley, A. J., & Beasley, D. W. (2016). Propagation and titration of west nile virus on vero cells. In *West Nile Virus* (pp. 19-27). Humana Press, New York, NY.

Mendonça, S. F., Rocha, M. N., Ferreira, F. V., Leite, T. H. F., Amadou, S. C., Sucupira, P. H., ... & Moreira, L. A. (2021). Evaluation of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes competence to Oropouche virus Infection. *Viruses*, 13(5), 755.

Mendoza, E. J., Manguiat, K., Wood, H., & Drebot, M. (2020). Two detailed plaque assay protocols for the quantification of infectious SARS-CoV-2. *Current protocols in microbiology*, 57(1), cpmc105.

- Millsapps, E. M., Underwood, E. C., & Barr, K. L. (2022). Development and application of treatment for Chikungunya fever. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 13, 55.
- Mishra, S., Pandey, A., & Manvati, S. (2020). Coumarin: An emerging antiviral agent. *Heliyon*, 6(1).
- Mulvey, M., & Brown, D. T. (1994). Formation and rearrangement of disulfide bonds during maturation of the Sindbis virus E1 glycoprotein. *Journal of virology*, 68(2), 805-812.
- Nascimento, C. J., Violante, I. M. P., Garcez, W. S., Pott, A., & Garcez, F. R. (2012). Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters*, 5(2), 401-406.
- Neto, J. A. R., Tarôco, B. R. P., Dos Santos, H. B., Thomé, R. G., Wolfram, E., & de A Ribeiro, R. I. M. (2020). Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 112547.
- Ninfali, P., Antonelli, A., Magnani, M., & Scarpa, E. S. (2020). Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies. *Nutrients*, 12(9), 2534.
- Novaes, P., Molinillo, J. M., Varela, R. M., & Macias, F. A. (2013). Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian savanna) plants. *Phytochemistry reviews*, 12, 839-855.
- Oliveira, A. C. B., Oliveira, A. P., Guimarães, A. L., Oliveira, R. A., Silva, F. S., Reis, S. A. G. B., ... & Almeida, J. R. G. S. (2013). Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L.(Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15, 244-249.
- Oliveira, D. C., Kaneko, T. M., Young, M. C. M., Murakami, C., Cordeiro, I., & Moreno, P. R. H. (2018). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Eugenia Dysenterica* DC essential oil. *Emerging Science Journal*, 2(6), 410-416.
- Oliveira, M. E. S., Pantoja, L., Duarte, W. F., Collela, C. F., Valarelli, L. T., Schwan, R. F., & Dias, D. R. (2011). Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. *Food Research International*, 44(7), 2391-2400.
- Oliveira, T. N. F. L., Costa, C. C., Estevam, D. D. P., Medeiros, I. A., Lima, E. C., Santos, V. M., & Oliveira, H. B. (2018). *Morus nigra* L.: revisão sistematizada das propriedades botânicas, fitoquímicas e farmacológicas. *Archives of Health Investigation*, 7(10), 450-454.

Oliveira-Alves, S., Lourenço, S., Fernandes, T. A., & Canas, S. (2024). Coumarins in Spirit Beverages: Sources, Quantification, and Their Involvement in Quality, Authenticity and Food Safety. *Applied Sciences*, 14(3), 1010.

Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.

Pandita, D., & Pandita, A. (2021). Secondary metabolites in medicinal and aromatic plants (MAPs): potent molecules in nature's arsenal to fight human diseases. In *Medicinal and Aromatic Plants* (pp. 41-84). Springer, Cham.

Pereda-Miranda, R., Bautista, E., Martínez-Fructuoso, L., & Fragoso-Serrano, M. (2022). From Relative to Absolute Stereochemistry of Secondary Metabolites: Applications in Plant Chemistry. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1-48.

Petersen, L. R., & Epstein, J. S. (2014). Chikungunya virus—new risk to transfusion safety in the Americas. *Transfusion*, 54(8), 1911.

Pezzi, L., Rodriguez-Morales, A. J., Reusken, C. B., Ribeiro, G. D. S., LaBeaud, A. D., Lourenco-de-Oliveira, R., ... & Simmons, G. (2019). GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. *Antiviral research*, 172, 104610.

Phadungsombat, J., Imad, H., Rahman, M., Nakayama, E. E., Kludkleeb, S., Ponam, T., ... & Shioda, T. (2020). A novel sub-lineage of chikungunya virus East/Central/South African Genotype Indian Ocean lineage caused sequential outbreaks in Bangladesh and Thailand. *Viruses*, 12(11), 1319.

Pietilä, M. K., Hellström, K., & Ahola, T. (2017). *Alphavirus* polymerase and RNA replication. *Virus research*, 234, 44-57.

Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2000). Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*, 81(2), 471-479.

Presti, A. L., Ciccozzi, M., Cella, E., Lai, A., Simonetti, F. R., Galli, M., ... & Rezza, G. (2012). Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 392-398.

Qadir, M. I., Ali, M., & Ibrahim, Z. (2014). Anti-cancer activity of *Morus nigra* leaves extract. ||| *Bangladesh Journal of Pharmacology*|||, 9(4), 496-97.

Rahman, M., Yamagishi, J., Rahim, R., Hasan, A., & Sobhan, A. (2019). East/central/south african genotype in a chikungunya outbreak, Dhaka, Bangladesh, 2017. *Emerging infectious diseases*, 25(2), 370.

Rangel, M. V., & Stapleford, K. A. (2021). *Alphavirus* virulence determinants. *Pathogens*, 10(8), 981.

Rashed, K. N., Ćirić, A., Glamočlija, J., Calhelha, R. C., Ferreira, I. C., & Soković, M. (2013). Antimicrobial activity, growth inhibition of human tumour cell lines, and phytochemical characterization of the hydromethanolic extract obtained from *Sapindus saponaria* L. aerial parts. *BioMed Research International*, 2013.

Rawat, A., & Reddy, A. V. B. (2022). Recent advances in the anticancer activity of coumarin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 5, 100038.

Repetto, G., Del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3(7), 1125-1131.

Riezebos-Brilman, A., de Mare, A., Bungener, L., Huckriede, A., Wilschut, J., & Daemen, T. (2006). Recombinant *Alphaviruses* as vectors for anti-tumour and anti-microbial immunotherapy. *Journal of clinical virology*, 35(3), 233-243.

Rochleder, F. (1850). *Ueber die Wurzel der Chiococca racemosa*.

Rodriguez, A. K., Muñoz, A. L., Segura, N. A., Rangel, H. R., & Bello, F. (2019). Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. *EXCLI journal*, 18, 988–1006.

Rosa, M. N., e Silva, L. R., Longato, G. B., Evangelista, A. F., Gomes, I. N., Alves, A. L. V., ... & Reis, R. M. (2021). Bioprospecting of natural compounds from Brazilian Cerrado biome plants in human cervical cancer cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3383.

Rose, P. P., Hanna, S. L., Spiridigliozzi, A., Wannissorn, N., Beiting, D. P., Ross, S. R., ... & Cherry, S. (2011). Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell host & microbe*, 10(2), 97-104.

Rosmalena, R., Elya, B., Dewi, B. E., Fithriyah, F., Desti, H., Angelina, M., ... & Seto, D. (2019). The antiviral effect of indonesian medicinal plant extracts against dengue virus *in vitro* and *in silico*. *Pathogens*, 8(2), 85.

Ross, R. W. (1956). The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties, and relationship to the epidemic. *Epidemiology & Infection*, 54(2), 177-191.

Rudrapal, M., & Chetia, D. (2021). Herbal Drugs: Efficacy, Toxicity, and Safety Issues. In *Evidence Based Validation of Traditional Medicines* (pp. 537-553). Springer, Singapore.

Ryman, K. D., & Klimstra, W. B. (2008). Host responses to *Alphavirus* infection. *Immunological reviews*, 225(1), 27-45.

Saadati, F., Chahardehi, A. M., Jamshidi, N., Jamshidi, N., & Ghasemi, D. (2024). Coumarin: A natural solution for alleviating inflammatory disorders. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*, 100202.

Sahoo, C. R., Sahoo, J., Mahapatra, M., Lenka, D., Sahu, P. K., Dehury, B., ... & Paidesetty, S. K. (2021). Coumarin derivatives as promising antibacterial agent (s). *Arabian Journal of Chemistry*, 14(2), 102922.

Sajid, M., Cameotra, S. S., Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2019). Nanoparticle-based delivery of phytomedicines: challenges and opportunities. *New look to phytomedicine*, 597-623.

Santiago, F. W., Halsey, E. S., Siles, C., Vilcarromero, S., Guevara, C., Silvas, J. A., ... & Aguilar, P. V. (2015). Long-term arthralgia after Mayaro virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(10), e0004104.

Santos, L. D., Viel, A. M., Tarosso, L. F., Momesso, L. D. S., Palmieri, D. A., & Spera, K. D. (2020). Medicinal plants of the Brazilian cerrado: Knowing to preserve. *Biosci. j.(Online)*, 556-567.

Santos, N. E., & Braga, S. S. (2021). Redesigning Nature: Ruthenium Flavonoid Complexes with Antitumour, Antimicrobial and Cardioprotective Activities. *Molecules*, 26(15), 4544.

Sardi, J. D. C. O., Freires, I. A., Lazarini, J. G., Infante, J., de Alencar, S. M., & Rosalen, P. L. (2017). Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microbial Pathogenesis*, 105, 280-287.

Saud, B., Malla, R., & Shrestha, K. (2019). A review on the effect of plant extract on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Stem cells international*, 2019(1), 7513404.

Schapoval, E. E. S., Schenkel, E. P., Chaves, C. M. G., & Zanata, A. (1983). Ensaios Químicos e Farmacológicos com a *Chiococca alba* (L.) Hitchc. *Anais do*, 2, 289-294.

Schlesinger, S., & Schlesinger, M. J. (Eds.). (2013). *The Togaviridae and Flaviviridae*. Springer Science & Business Media.

Schmidt, C., & Schnierle, B. S. (2022). Chikungunya vaccine candidates: current landscape and prospects. *Drug Design, Development and Therapy*, 3663-3673.

Schnierle, B. S. (2019). Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus. *Viruses*, 11(11), 1078.

Schuffenecker, I., Itman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., ... & Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS medicine*, 3(7), e263.

Schwab, W. (2003). Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 62(6), 837-849.

Shin, G., Yost, S. A., Miller, M. T., Elrod, E. J., Grakoui, A., & Marcotrigiano, J. (2012). Structural and functional insights into *Alphavirus* polyprotein processing and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16534-16539.

Silva, A. G., Silva, V. A. O., Oliveira, R. J., de Rezende, A. R., Chagas, R. C. R., Pimenta, L. P. S., ... & de Azambuja Ribeiro, R. I. M. (2020). Matteucinol, isolated from *Miconia chamissois*, induces apoptosis in human glioblastoma lines via the intrinsic pathway and inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Investigational New Drugs*, 38, 1044-1055.

Silva, C. A. G. (2016). Contribuição ao estudo químico e de atividade biológica de *Eugenia dysenterica* Mart. ex. dc. berg (Myrtaceae). Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/21109>.

Singh, A., Kumar, A., Uversky, V. N., & Giri, R. (2018). Understanding the interactability of chikungunya virus proteins via molecular recognition feature analysis. *RSC advances*, 8(48), 27293-27303.

Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., ... & Schwartz, O. (2007). Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS pathogens*, 3(6), e89.

Stefanello, M. É. A., Pascoal, A. C., & Salvador, M. J. (2011). Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry & biodiversity*, 8(1), 73-94.

Strauss, J. H., & Strauss, E. G. (1994). The *Alphaviruses*: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, 58(3), 491-562.

Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199-1209.

Syahputra, R. A., Harahap, U., Dalimunthe, A., Nasution, M. P., & Satria, D. (2022). The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules*, 27(4), 1320.

Tan, Y., Pickett, B. E., Shrivastava, S., Gresh, L., Balmaseda, A., Amedeo, P., ... & Harris, E. (2018). Differing epidemiological dynamics of Chikungunya virus in the Americas during the 2014-2015 epidemic. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(7), e0006670.

Tian, C., Chang, Y., Zhang, Z., Wang, H., Xiao, S., Cui, C., & Liu, M. (2019). Extraction technology, component analysis, antioxidant, antibacterial, analgesic and anti-inflammatory activities of flavonoids fraction from *Tribulus terrestris* L. leaves. *Heliyon*, 5(8), e02234.

Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens*, 3(12), e201.

Tsuzuki, J. K., Svidzinski, T. I., Shinobu, C. S., Silva, L. F., Rodrigues-Filho, E., Cortez, D. A., & Ferreira, I. C. (2007). Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79, 577-583.

Venturi, G., Di Luca, M., Fortuna, C., Remoli, M. E., Riccardo, F., Severini, F., ... & Rizzo, C. (2017). Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Eurosurveillance*, 22(39), 17-00646.

Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*, 2013(1), 963248.

Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A. A., & Failloux, A. B. (2021). Vector specificity of arbovirus transmission. *Frontiers in Microbiology*, 12, 773211.

ViralZone. Human viruses and associated pathologies, 2025. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/>. Acesso em 10 de dezembro de 2024.

ViralZone. Togaviridae, 2017. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/>. Acesso em 11 de dezembro de 2022.

Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., ... & Weaver, S. C. (2010). Genome-scale phylogenetic analyses of Chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of virology*, 84(13), 6497-6504.

Wagner, H. (1996). *Plant Drug Analysis in A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.

Wang, L., Song, J., Liu, A., Xiao, B., Li, S., Wen, Z., ... & Du, G. (2020). Research progress of the antiviral bioactivities of natural flavonoids. *Natural products and bioprospecting*, 10(5), 271-283.

Weaver, S. C. (2018). Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. *Antiviral research*, 156, 80-84.

Weaver, S. C., & Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, genetics and evolution*, 9(4), 523-540.

Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N., & Lecuit, M. (2018). Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. *Annual review of medicine*, 69(1), 395-408.

Weaver, S. C., Chen, R., & Diallo, M. (2020). Chikungunya virus: role of vectors in emergence from enzootic cycles. *Annual Review of Entomology*, 65, 313-332.

Weaver, S. C., Forrester, N. L., Liu, J., & Vasilakis, N. (2021). Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 184-195.

Weinbren, M. P., Haddow, A. J., & Williams, M. C. (1958). The occurrence of chikungunya virus in Uganda I. Isolation from mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(3), 253-262.

Weller, M. G. (2012). A unifying review of bioassay-guided fractionation, effect-directed analysis and related techniques. *Sensors*, 12(7), 9181-9209.

Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kääriäinen, L., ... & Trent, D. W. (1985). Flaviviridae. *Intervirology*, 24(4), 183-192.

Wilder-Smith, A., Gubler, D. J., Weaver, S. C., Monath, T. P., Heymann, D. L., & Scott, T. W. (2017). Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *The Lancet infectious diseases*, 17(3), e101-e106.

Xu, Y. B., Chen, G. L., & Guo, M. Q. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory activities of the crude extracts of *Moringa oleifera* from Kenya and their correlations with flavonoids. *Antioxidants*, 8(8), 296.

Xu, Z., Chen, Q., Zhang, Y., & Liang, C. (2021). Coumarin-based derivatives with potential anti-HIV activity. *Fitoterapia*, 150, 104863.

Yadesa, T. M., Ogwang, P. E., & Tolo, C. U. (2020). Quality Control for the Safety of Natural Products. *Poisonous Plants and Phytochemicals in Drug Discovery*, 213-224.

Yuan, G., Guan, Y., Yi, H., Lai, S., Sun, Y., & Cao, S. (2021). Antibacterial activity and mechanism of plant flavonoids to gram-positive bacteria predicted from their lipophilicities. *Scientific reports*, 11(1), 1-15.

Yusufzai, S. K., Osman, H., Khan, M. S., Razik, B. M. A., Mohamad, S., Sulaiman, O., ... & Razak, I. A. (2018). Synthesis, X-ray crystallographic study, pharmacology and docking of hydrazinyl thiazolyl coumarins as dengue virus NS2B/NS3 serine protease inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, 27, 1647-1665.

Zacks, M. A., & Paessler, S. (2010). Encephalitic *Alphaviruses*. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 281-286.

Zaidun, N. H., Thent, Z. C., & Abd Latiff, A. (2018). Combating oxidative stress disorders with citrus flavonoid: Naringenin. *Life sciences*, 208, 111-122.

Zhang, X., Huang, Y., Wang, M., Yang, F., Wu, C., Huang, D., ... & Zhang, R. (2018). Differences in genome characters and cell tropisms between two chikungunya isolates of Asian lineage and Indian Ocean lineage. *Virology journal*, 15(1), 1-10.

Zhou, G., Liao, B., Li, Q., Xu, J., & Chen, S. (2021). Establishing a Genomic Database for the Traditional Medicinal Plants in the Brazilian Pharmacopoeia.