



Universidade Federal
de Ouro Preto

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Escola de Farmácia



Gabriel Mendonça Valente

**Estudo fitoquímico, avaliação da atividade citotóxica e antiviral do extrato da espécie
Bidens pilosa contra Chikungunya, Mayaro e Zika vírus**

OURO PRETO-MG

2022

Gabriel Mendonça Valente

**Estudo fitoquímico, avaliação da atividade citotóxica e antiviral do extrato da espécie
Bidens pilosa contra Chikungunya, Mayaro e Zika vírus**

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

Orientadora: Prof. Geraldo Célio Brandão

Co-orientadora: Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis

OURO PRETO-MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

V154e Valente, Gabriel Mendonca.

Estudo fitoquímico, avaliação da atividade citotóxica e antiviral do extrato da espécie *Bidens pilosa* contra Chikungunya, Mayaro e Zika vírus. [manuscrito] / Gabriel Mendonca Valente. - 2022.

51 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão.

Coorientadora: Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis.

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

1. Farmacognosia. 2. *Bidens*. 3. Vírus da Zika. 4. Chikungunya. 5. Infecções por Alphavirus. I. Brandão, Geraldo Célio. II. Reis, Adriana Cotta Cardoso. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.3

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriel Mendonça Valente

Estudo fitoquímico, avaliação da atividade citotóxica e antiviral do extrato da espécie Bidens pilosa (Asteraceae)

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

Aprovada em 22 de junho de 2022

Membros da banca

Dr. Geraldo Célio Brandão - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis - Coorientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr. Luíz Fernando de Medeiros Teixeira - (Universidade Federal de Ouro Preto)
Mr. Jordano Augusto Carvalho Sousa - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Geraldo Célio Brandão, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 01/07/2022



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Celio Brandao, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/07/2022, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0355678** e o código CRC **39207A5A**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à escola de farmácia pela oportunidade de aprendizado e fornecer o laboratório para os estudos, gostaria de agradecer à UFOP pelo ensino público de qualidade e pela estrutura fornecida. As agências de fomento CNPQ e FAPEMIG pelas bolsas e a possibilidade de uma dedicação aos estudos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Perfis em CCD da pesquisa de geninas flavônicas do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: clorofórmio - acetato de etila (60:40). Revelador NP/PEG. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico semi-purificado e o extrato etanólico bruto e à direita o padrão de quercetina. UV₃₆₅ nm. 30
- Figura 2: Perfis em CCD da pesquisa de heterosídeos flavônicos do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético – água (100:11:11:27) Revelador NP/PEG. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de rutina . UV₃₆₅ nm..... 30
- Figura 3: Perfis em CCD da pesquisa de geninas antraquinônicas do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: tolueno – acetona – clorofórmio (40:5:35) Revelador: KOH 5%. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de 1,8-di-hidróxi-antraquinona UV₃₆₅ nm. 31
- Figura 4: Perfis em CCD da pesquisa de heterosídeos antracênicos do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: acetato de etila – metanol – água (81:11:8) KOH 5%. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de aloína UV₃₆₅ nm. 31
- Figura 5: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: hexano – acetato de etila (40:20) Revelador LB. Onde novamente à esquerda temos o extrato bruto e à direita temos o β-sitosterol (esteróide) e depois ácido oleanólico (triterpeno)..... 32
- Figura 6: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: tolueno – éter saturado com 5 gotas de ácido acético (80: 20) Revelador: KOH 5%. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de cumarina e escopoletina UV₃₆₅ nm..... 32
- Figura 7: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: clorofórmio – ácido acético glacial - metanol – água (15:8:3:2) Revelador Anisaldeído Sulfúrico.Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de Digitonina 33
- Figura 8: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético - água –

etilmetilcetona (50:7:3:10:30) reagente de Dragendorff Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de Estricnina..... 33

Figura 10: Perfil cromatográfico da fração AcOEt 39

Figura 11: Perfil cromatográfico fração GV-07 40

Figura 12: Sistemas de absorção em UV-VIS do núcleo aromático dos flavonoides. 41

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------|---|
| ACN | Acetonitrila |
| CC50 | Concentração citotóxica a 50 % |
| CCD | Cromatografia em camada delgada de sílica gel |
| CE50 | Concentração efetiva a 50 % |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| CHIKV | Chikungunya Virus |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CLUE | Cromatografia líquida de ultra eficiência |
| DAD | Arranjo de diodos |
| DCM | Diclorometano |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EM | Espectrometria de massa |
| AcOEt | Acetato de Etila |
| EtOH | Etanol |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FR | Fase reversa |
| H2O/MeOH | Hidrometanólica |
| IC50 | Concentração inibitória a 50 % |
| IS | Índice de seletividade |
| MAYV | Mayaro vírus |

| | |
|--------|--|
| MeOH | Metanol |
| MTT | Brometo de 3-(4',5'-dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol |
| NP-PEG | Produto natural – polietilenoglicol |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | Tampão fostato |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| SFB | Soro fetal bovino |
| TCID50 | Diluição de vírus exigida para infectar 50% da cultura celular |
| TR | Tempo de retenção |
| UFOP | Universidade Federal de Ouro Preto |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Healthy Organization |
| ZIKV | Zika vírus |

RESUMO

Espécies do gênero *Bidens*, família Asteraceae, são empregadas na medicina popular para o tratamento sintomático de infecções com possíveis causa de infecções virais. Dentro deste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial antiviral de extratos etanólico da espécie *Bidens pilosa*. Adicionalmente, foi realizado o fracionamento do extrato por partição líquido-líquido e a fração em acetado de etila foi refracionada empregando peneira molecular (Sephadex LH20®). A caracterização química de extratos e frações foi realizada por prospecção fitoquímica empregando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) aliada a reveladores seletivos e por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a um espectrômetro de massa de alta resolução (CLUE-UV-EM). A prospecção fitoquímica revelou a presença de metabólitos secundários da classe dos terpenos (triterpenos e esteroides) e compostos fenólicos, como flavonoides. As análises por CLUE-UV-EM confirmou a presença de flavonoides sendo identificados flavonoides das subclasses flavonol, auronas e chalconas. Nos ensaios biológicos que avaliaram a atividade citotóxica e antiviral de extratos e frações empregou-se o método colorimétrico do MTT. Nos ensaios de toxicidade empregou-se as linhagens de células MRC-5 (Fibroblasto de pulmão humano) e Vero (Rim de macaco verde africano). A atividade antiviral foi avaliada contra os arbovírus Zika, Chikungunya e Mayaro. O extrato etanólico da *Bidens pilosa* mostrou-se moderadamente citotóxico, mas com atividade significativa contra o Zika-vírus, Chikungunya-vírus e Mayaro-vírus, com CE_{50} de $84,71 \pm 3,08$, $182,30 \pm 5,31$, $145,80 \pm 2,85$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Adicionalmente, a fração em acetato de etila também demonstrou atividade contra os vírus Zika e Mayaro com CE_{50} de $150,80 \pm 2,20$, $265,30 \pm 1,54$, $176,50 \pm 1,97$ $\mu\text{g/mL}$. O fracionamento por Sephadex levou a obtenção de 7 frações das quais a fração GV-07 demonstrou ainda melhor atividade contra os vírus Zika e Mayaro com CE_{50} de $45,53 \pm 1,93$ e $27,58 \pm 2,82$ $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

ABSTRACT

Species of the genus *Bidens*, family Asteraceae, are used in folk medicine for the symptomatic treatment of infections with a possible cause of viral infections. Within this context, the present study aimed to evaluate the antiviral potential of ethanolic extracts from the species *Bidens pilosa*. Additionally, the extract was fractionated by liquid-liquid partition and the ethyl acetate fraction was refracted using a molecular sieve (Sephadex LH20[®]). The chemical characterization of extracts and fractions was carried out by phytochemical prospecting using Thin Layer Chromatography (TCD) combined with selective developers and by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometer (CLUE-UV-EM). Phytochemical prospection revealed the presence of secondary metabolites of the terpene class (triterpenes and steroids) and phenolic compounds among flavonoids. The analyzes by CLUE-UV-EM confirmed the presence of flavonoids and flavonoids of the flavonol, aurones, and chalcones subclasses were identified. In the biological assays that evaluated the cytotoxic and antiviral activity of extracts and fractions, the MTT colorimetric method was used. The cell lines MRC-5 (human lung fibroblast) and Vero (African green monkey kidney) were used in the toxicity tests. Antiviral activity was evaluated against Zika, Chikungunya, and Mayaro arboviruses. The ethanolic extract of *Bidens pilosa* was shown to be moderately cytotoxic, but with significant activity against the Zika virus, with an EC₅₀ of $84.71 \pm 3.8 \mu\text{g/mL}$. Additionally, the ethyl acetate fraction also demonstrated activity against the Zika, Chikungunya and Mayaro virus. Sephadex fractionation resulted in 7 fractions of which only the GV-07 fraction showed activity against the Zika and Mayaro virus with an EC₅₀ of $45,53 \pm 1,93, 27,58 \pm 2,82 \mu\text{g/mL}$.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução: | 12 |
| 2. Revisão Bibliográfica:..... | 13 |
| 3. Objetivos: | 16 |
| 2.2 Objetivo Geral: | 16 |
| 2.3 Objetivos Específicos:..... | 16 |
| 4. Materiais e métodos: | 16 |
| 3.1 Obtenção de extratos: | 16 |
| 4.1.1. Fracionamento do extrato etanólico da <i>Bidens pilosa</i> : | 16 |
| 4.1.2. Refracionamento da fração Acetato de Etila obtida do extrato da planta inteira de <i>Bidens pilosa</i> : | 17 |
| 4.1.3. Prospeção fitoquímica do extrato etanólico | 18 |
| 4.1.4. Detecção de geninas flavônicas | 18 |
| 4.1.5. Detecção de heterosídeos flavônicos | 19 |
| 4.1.6. Detecção de geninas antraquinônicas | 19 |
| 4.1.7. Detecção de heterosídeos antracênicos..... | 20 |
| 4.1.8. Detecção de triterpenos e esteróides | 20 |
| 4.1.9. Detecção de cumarinas | 21 |
| 4.1.10. Detecção de saponinas | 21 |
| 4.1.11. Detecção de alcaloides | 21 |
| 4.1.12. Ensaio Biológicos | 22 |
| 4.1.13. Ensaio de citotoxicidade utilizando a técnica colorimétrica MTT..... | 23 |
| 4.1.14. Avaliação antiviral <i>in vitro</i> | 25 |
| 4.1.15. Triagem da atividade antiviral pela técnica colorimétrica do MTT..... | 25 |
| 4.1.16. Análise estatística dos dados | 26 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.1.17. | Determinação do Índice de Seletividade..... | 27 |
| 4.1.18. | Perfis cromatográficos adquiridos através de RP-UPLC-DAD-MS | 27 |
| 5. | Resultados e discussão: | 28 |
| 5.1.1. | Obtenção dos extratos e cálculos de rendimento: | 28 |
| 5.2.1. | Dados cromatográficos em cromatografia de camada delgada: | 29 |
| 5.2.2. | Prospecção fitoquímica do extrato etanolico de <i>Bidens pilosa</i> : | 30 |
| 5.2.3. | Detecção de geninas flavônicas | 30 |
| 5.2.4. | Detecção de heterosídeos flavônicos | 30 |
| 5.2.5. | Detecção de geninas antraquinônicas | 31 |
| 5.2.6. | Detecção de heterosídeos antracênicos..... | 31 |
| 5.2.7. | Detecção de triterpenos e esteróides | 32 |
| 5.2.8. | Detecção de cumarinas | 32 |
| 5.2.9. | Detecção de saponinas | 33 |
| 5.2.10. | Detecção de alcaloides | 33 |
| 4.2 | Ensaio Biológicos:..... | 34 |
| 4.2.1 | Avaliação da atividade citotóxica do extrato etanólico e frações | 34 |
| 4.2.2 | Avaliação atividade antiviral | 36 |
| 5 | Componentes identificáveis no extrato e frações de <i>Bidens pilosa</i> | 37 |
| 5.2.1 | Perfil cromatográfico da fração em acetato de etila e fração GV-07..... | 38 |
| 6 | Conclusão | 47 |
| 7 | Referências | 48 |

1. Introdução:

Há tempos incontáveis que a humanidade utiliza de produtos naturais para tratamentos de doenças, a utilização do mel era utilizada pelos antigos egípcios e gregos para tratar infecções de feridas, odor desagradáveis, edemas e ajudar na cicatrização (LUCIA; ESCOBAR; XAVIER, 2013) na China há milênios ocorre o uso tradicional de plantas medicinais como forma de tratamento para doenças (ESMOT, 2015).

Plantas são um ótimo material para o desenvolvimento de drogas/fármacos, sendo utilizada para produtos a partir de suas moléculas ou apenas suas moléculas purificadas e isso pode ser notado nas principais áreas terapêuticas. Durante o período de 1981 e 2014, dos 141 antibacterianos aprovados pela FDA, 73% foram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Também nesse período de 1981 a 2014, nos Estados Unidos, tivemos a aprovação e a comercialização de 1562 medicamentos antitumorais, desses 4% eram de origem natural; 21% eram produtos naturais semissintéticos; 1% fitoterápicos e 14% produtos sintéticos cujo farmacóforo modelo foi obtido de um produto natural (NEWMAN & CRAGG, 2016).

No final de 1970 foi criado pela OMS o Programa de Medicina Tradicional, que tem como objetivo recomendar e promover o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde (WHO, 1978; BRASIL, 2006). A OMS utiliza o termo Medicina Tradicional para se referir às práticas médicas originárias da cultura de cada país, tendo em vista que o Brasil é um país extremamente rico em sua diversidade de flora em conjunto com o conhecimento medicinal empírico acumulado ao longo da história pelos indígenas, o uso de plantas medicinais é uma alternativa que deve ser abordada e incentivada (GRANDI et al., 1989; WHO, 2013).

Buscando abordar e incentivar o uso de novas formas de se ver o cuidado da saúde, procurando maneiras mais humanizadas, econômicas, levando em consideração a cultura e conhecimentos empíricos, foi estabelecido a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) em 2006, além disto, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2009) busca garantir um acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e

fitoterápicos, levando ao uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006, 2009).

Como abordado anteriormente, o Brasil sendo um país tropical, em relativo crescimento populacional em conjunto com a presença de todos os vetores e vírus já em seu território, resolvemos realizar um estudo sobre a atividade antiviral da espécie, principalmente focado em vírus geralmente negligenciados como o Zika vírus, Mayaro vírus e o Chikungunya vírus.

Diante disso, o nosso trabalho teve como objetivo avaliar a atividade do extrato etanólico desta espécie contra os arbovírus Zika vírus, Mayaro vírus e Chikungunya vírus.

2. Revisão Bibliográfica:

A família Asteraceae, ao qual o gênero *Bidens* pertence, é conhecida pela presença de flavonóides e terpenoides e suas espécies geralmente são conhecidas principalmente pelas suas ações antibióticas e anti-inflamatórias (LUCCHETTI et al., 2009).

O gênero *Bidens* contém cerca de 230 espécies de porte herbáceo, a maior parte destas plantas conseguem crescer em ambientes simples, ruderais e são distribuídas ao longo de toda a zona intertropical do planeta (HARRI LORENZI, 2000). A espécie abordada é uma erva pequena, anual, podendo apresentar altura de 0,3 a 1,5 m e é ramificada desde a base. Possui talos tetragonais, é glabra e apresenta folhas opostas, pecioladas, bordas serrilhadas e inflorescências em capítulos terminais com flores tubulares e radiadas, frutos escuros quando maduros e formados por aquênios lineares ou fusiformes (HARRI LORENZI, 2000).

Em sua história o picão-preto, como a *Bidens pilosa* é popularmente conhecida, vem sendo utilizado como chá, folha macerada para ação local e extrato aquoso bruto. Em usos populares a planta é utilizada para tratamentos de icterícia, inflamação nos rins, cicatrização de feridas, antimalárico e como hipoglicemiante, podendo ajudar no controle da diabetes. (BRASIL, 2015)

Em 2009 a *Bidens pilosa* foi incluída na lista RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), que contém 71 espécies medicinais a serem estudadas de forma mais sistemática para sustentar suas utilizações nos programas nacionais de saúde, assim em 2015

foi criada uma monografia de sua espécie, dando destaque para suas inúmeras aplicações e usos, tanto empíricos quanto cientificamente comprovados.

Alguns de seus usos culturais já foram comprovados cientificamente, dentre eles, protetor hepático (SUZIGAN et al., 2009) emenagogo e antidiarreica (RIVERA; OBÓN, 1995), dores de garganta, problemas de estômago, anti-inflamatória (comprovada pelos poliacetilenos) e asma (BAUER; REDL; DAVIS, 1992), fungicida e fungistática (CAMPBELL et al., 1982).

Com ensaios *in vitro* foram demonstradas várias aplicações, como atividade antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória, anti-histamínica, antidiabética, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antimalárica, antileishmaniose, anti-helmíntica e fotoprotetora. Em estudos *in vivo* foram comprovados, atividades analgésica e antipirética, anti-inflamatória, antiulcerogênica, gastroprotetora e antisecretora, antidiarreica, anti-herpética, antitripanossoma, anti-hipertensiva, diurética, hepatoprotetora, hipoglicemiante, antimalárica, antineoplásica, cicatrizante e uterotrófica (BRASIL, 2015).

Arbovírus são vírus cuja parte de seu ciclo de replicação ocorre em artrópodes, assim, podem ser transmitidos aos seres humanos e outros animais através de insetos hematófagos, por exemplo. Estima-se que existem mais de 545 espécies de arbovírus, sendo dentre estas, 150 relacionadas a doenças em seres humanos. Com o aumento da urbanização, mudanças climáticas, desmatamentos, os seres humanos tem tido mais e mais contato com os diferentes tipos de insetos, aumentando assim a transmissão de doenças dispersas por estes insetos (LOPES et al., 2014).

O Brasil é um dos maiores países do mundo no quesito território, tendo um pouco mais de 8.500.000 km², situado em uma área predominantemente tropical, com extensas florestas na Região Amazônica, além de florestas no leste, sudeste e litoral sul. Apresenta também uma grande região de pântano (Pantanal) no centro-oeste, uma região de savana (Cerrado), na área do planalto central, e uma região seca (Caatinga) no interior nordestino. A maior parte do País tem um clima tropical, sendo um local adequado para a existência do vetor e, portanto, para a ocorrência de arboviroses (LOPES et al., 2014).

O Chikungunya (CHIKV) é um RNA vírus da família Togaviridae do gênero Alphavirus, inicialmente foi confundido com a dengue foi descoberto onde hoje se encontra a Tanzânia. A Chikungunya possui sintomas muito parecidos com o da dengue como, quadros de febre associados à dor articular intensa e debilitante, cefaleia e mialgia. Porém seu quadro de poliartrite pode durar

meses após o quadro febril/infecção. Associado a isso ainda temos que o vírus apresenta características que o torna capaz de causar epidemias maiores que a da dengue pois pode ser transmitida tanto pelo *Aedes aegypti* quanto pelo *Aedes albopictus*, caso não estudado e ser pensado um tratamento eficaz contra o vírus, ele pode se tornar um grande desafio para a saúde pública do país (DONALISIO et al., 2015; RIBEIRO et al., 2018)

Também pertencente à família Togaviridae temos o Mayaro virus (MAYV), inicialmente isolado no Caribe e pouco tempo depois encontrado no Pará, o MAYV foi responsável por pequenas epidemias no Brasil, Bolívia e Peru e tem como vetor o *Haemagogus janthinomys*. Estima-se que tenha causado mais de 500,000 infecções em humanos e ainda é causador de surtos em países tropicais como o Brasil, tem como principais sintomas, febre alta, cefaleia, mialgia, erupções cutâneas e dores intensas nas articulações (RIBEIRO et al., 2018)

O vírus Zika (ZIKV) é um Flavivirus pertencente à família Flaviridae é um vírus com genoma de RNA transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* e foi isolado pela primeira vez em 1947 de um macaco na floresta de Zika, Uganda, em estudos da febre amarela. Após alguns anos foram encontradas infecções em humanos em várias regiões do continente africano.(LAERTE PINTO JUNIOR et al., [s.d.]). Em 2015 tivemos os primeiros casos de Zika registrados no Brasil, pacientes relatando febre leve, mialgia, cefaleia, conjuntivite não purulenta, tontura e dores nas juntas. Em março do mesmo ano descobriram que o vírus tinha uma similaridade muito grande com o Zika encontrado na ásia (ZANLUCA et al., 2015). Apesar de seus sintomas e riscos para adultos abaixo dos 60 anos serem baixos, podem ocorrer duas complicações neurológicas graves: Síndrome de Guillan-Barré (SGB), uma condição rara em que o sistema imunológico ataca os nervos periféricos, e efeitos congênitos, ocorrendo quando gestantes infectadas transmitem o vírus ao feto resultando em aborto espontâneo, óbito fetal ou malformações congênitas como a microcefalia (BRASIL, 2017).

3. Objetivos:

2.2 Objetivo Geral:

Avaliação da atividade antiviral e citotóxica do extrato etanólico da espécie *Bidens pilosa* e caracterização química por técnicas cromatográficas.

2.3 Objetivos Específicos:

- Coleta, secagem e obtenção do extrato etanólico;
- Fracionamento do extrato etanólico por partição líquido-líquido;
- Fracionamento cromatográfico empregando Sephadex LH-20®;
- Utilização de cromatografia de camada delgada para comparar Fatores de Retenção entre as frações;
- Avaliar a atividade citotóxica e antiviral do extrato e das frações adquiridas do fracionamento cromatográfico contra o CHIKV, ZIKV e MAYV;
- Utilizar CLUE-FR-DAD-EM para caracterização química dos constituintes do extrato desta espécie.

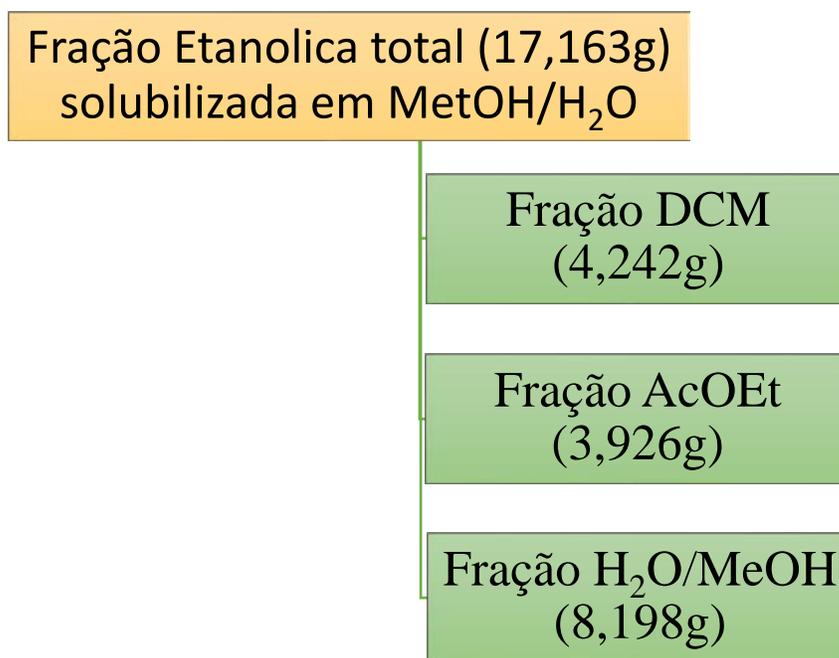
4. Materiais e métodos:

3.1 Obtenção de extratos:

A planta inteira (caules, folhas, raízes e frutos) foi seca em estufa ventilada a 40°C. Após secagem do material vegetal, foi realizada a moagem empregando um moinho de facas, em seguida, o pó obtido (329,0 g) foi acondicionado em um recipiente de vidro. O pó foi submetido à extração exaustiva por percolação a frio, com etanol 92,8° INPM. O extrato etanólico obtido foi concentrado por destilação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 50 °C. Para completa remoção do solvente o extrato concentrado foi transferido para frascos previamente pesados e logo após foram cuidadosamente secos em estufa a 50°C. Por fim, o extrato seco da planta *Bidens pilosa* foi pesado para se ter o cálculo de rendimento.

4.1.1. Fracionamento do extrato etanólico da *Bidens pilosa*:

Uma porção (17,2 g) do extrato etanólico foi submetido a uma partição líquido-líquido. O extrato foi solubilizado em uma mistura Metanol/Água (MeOH/H₂O) (60:40) e particionado com Diclorometano (DCM) e Acetato de Etila (AcOEt) 3 vezes com 100 mL de solvente por extração de cada solvente. Após, as frações foram concentradas em um rota-evaporador a 50°C e seco em estufa também a 50°C.



4.1.2. Refracionamento da fração Acetato de Etila obtida do extrato da planta inteira de *Bidens pilosa*:

Foi submetida ao fracionamento, 500 mg da fração acetato de etila utilizando a cromatografia de exclusão molecular/filtração em gel, para isso foi empregado a resina Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech®). No empacotamento da coluna empregou-se 30,0g de Sephadex LH-20 (ø70 µm) como fase estacionária e a eluição foi realizada com o solvente metanol de forma isocrática.

Foram coletadas em média 50 frações em frascos de vidro tipo penicilina com aproximadamente 8 mL cada, os números de frascos eram decididos de acordo com o grau de separação desejado e até a cor característica alaranjada/amarelada ser totalmente eluída, este refractionamento utilizando 500mg de extrato foi repetido 6 vezes a fim de conseguir maior massa para testes. Todas as frações foram submetidas a análise por cromatografia em camada delgada

(CCD) e os componentes de Fator de Retenção (RF) semelhantes foram agrupados entre si. Os resultados revelaram que as frações 49 a 56 obtidas da coluna 1, levou à concentração de um sólido castanho escuro denominado GV-07 (2mg). Em todas as análises por CCD empregou-se acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/ clorofórmio (100:11:11:27) como fase móvel, e como revelador NP/PEG.

Visando uma melhor separação dos componentes e verificar as purificações foi empregado uma nova fase móvel permitindo melhor separação entre as polaridades, para isso utilizou-se Clorofórmio/ Acetato de Etila/ Metanol/ Ácido acético glacial/ Ácido fórmico (60:20:10:5:5), com esta diferença de polaridade conseguimos identificar outros 2 compostos em maior quantidade. Como obtivemos pouca quantidade de componentes purificados em cada fração, tivemos de reunir as frações semelhantes obtidas da repetição (6 repetições) de refração, com isso como as frações não estavam muito purificadas fomos também acumulando pequenas impurezas.

4.1.3. Prospecção fitoquímica do extrato etanólico

Realizou-se uma prospecção fitoquímica do extrato alcoólico da planta *Bidens pilosa* para comparação entre elas através de cromatografia em camada delgada, sendo utilizadas placas analíticas (10x10cm), como fase estacionária sílica gel, Kieselgel 60 G (Merck), preparadas com 0,5 mm de espessura desta sílica.

Foram avaliadas a presença de cumarinas, saponinas, heterosídeos flavônicos, geninas flavônicas, heterosídeos antraquinônicos, geninas antraquinônicas, triterpenos, esteroides e alcaloides. Diferentes sistemas de eluentes e reveladores seletivos para cada classe de produto natural foram utilizados nas análises (WAGNER et al., 1996). As manchas foram visualizadas por exposição das placas cromatográficas sob a luz ultravioleta (Cienlab UV 254/365 nm) ou por adição de reveladores específicos para metabólitos secundários conforme descritos nas técnicas abaixo (WAGNER et al., 1996).

4.1.4. Detecção de geninas flavônicas

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: clorofórmio - acetato de etila (60:40)

Visualização: observar a placa à luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄, após revelação com NP/PEG e aquecimento a 100 °C, por 5 min.

Geninas flavônicas: manchas de cor amarela (vis.) e fluorescências amarelo-esverdeadas (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Amostras de referência: quercetina

4.1.5. Detecção de heterosídeos flavônicos

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético – água (100:11:11:27)

Visualização: observar a placa à luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄, após revelação com NP/PEG e aquecimento a 100 °C, por 5 min.

Flavonoides: manchas de cor amarela (vis.) e fluorescências amarelo-esverdeadas (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Amostras de referência: rutina.

4.1.6. Detecção de geninas antraquinônicas

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: tolueno – acetona – clorofórmio (40:5:35)

Visualização: observar a placa à luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄, após revelação com hidróxido de potássio a 5%, em metanol, e aquecimento a 100 °C, por 5 min.

Antraquinonas e naftoquinonas: manchas de cor laranja a vermelho (vis) e fluorescências de coloração do alaranjado ao vermelho (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Antronas e antranóis: manchas amarelas (vis) e fluorescências de coloração do alaranjado (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Amostras de referência: 1,8-di-hidróxi-antraquinona

4.1.7. Detecção de heterosídeos antracênicos

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: acetato de etila – metanol – água (81:11:8)

Visualização: observar a placa à luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄, após revelação com hidróxido de potássio a 5%, em metanol, e aquecimento a 100 °C, por 5 min.

Antraquinonas: manchas de coloração laranja ao vermelho (vis) e fluorescências laranja ao vermelho (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Antronas, antranóis: manchas amarelas (vis) e fluorescências de coloração do alaranjado ao vermelho (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Amostra de referência: aloína.

4.1.8. Detecção de triterpenos e esteróides

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: hexano – acetato de etila (40:20)

Visualização: Reagente de Liebermann-Burchard; observar a placa, imediatamente, à luz visível, ou após aquecimento a 100 °C, por 10 min.

Triterpenos e esteróides: manchas marrons ou acinzentadas (vis) e fluorescências do alaranjado ao vermelho (UV₃₆₅ e UV₂₅₄).

Amostras de referência: ácido oleanóico (triterpeno) e β-sitosterol (esteróide).

4.1.9. Detecção de cumarinas

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: tolueno – éter saturado com 5 gotas de ácido acético (80: 20)

Visualização: observar a placa à luz UV₃₆₆ e UV₂₅₄, após revelação com hidróxido de potássio a 5%, em metanol, e aquecimento a 100 °C, por 5 min.

Cumarinas: manchas de cor verde azulada sob UV₃₆₅ e UV₂₅₄; coloração intensificada após tratamento com hidróxido de potássio; a cumarina não substituída apresenta fluorescência amarelo-esverdeada apenas após o tratamento com hidróxido de potássio.

Amostras de referência: cumarina e escopoletina.

4.1.10. Detecção de saponinas

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: clorofórmio – ácido acético glacial - metanol – água (15:8:3:2)

Visualização: observar a placa à luz visível após revelação com anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100 °C, por 5 min.

Saponinas: manchas de coloração azul ou azul-violeta e zonas amarelas (vis).

Amostra de referência: digitonina.

4.1.11. Detecção de alcaloides

Sistema cromatográfico (BRANDÃO, 2010)

Fase estacionária: sílica gel 60G, sobre placa de vidro (10x10)

Fase móvel: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético - água – etilmetilcetona (50:7:3:10:30)

Visualização: observar a placa após revelação com o reagente de Dragendorff (vis).

Alcaloides: manchas de cor marrom ou alaranjada (vis).

Amostras de referência: Estricnina.

4.1.12. Ensaio Biológicos

Os ensaios biológicos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos, do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, e no Laboratório de Química Medicinal e Bioensaios, da Escola de Farmácia, da Universidade Federal de Ouro Preto. Nestes ensaios foram utilizadas as seguintes linhagens celulares e vírus:

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

Chikungunya virus (CHIKV): A amostra de CHIKV (527-African) utilizada para a propagação *in vitro* deste vírus foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, do Instituto de Pesquisa em Virologia da Universidade Federal de São Paulo.

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

Células C6/36: As células C6/36 são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus*, multiplicadas em meio L15 suplementado com 5 % SFB contendo, penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à 28°C. Estas células foram utilizadas na produção do vírus estoque de ZIKV.

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

Células Vero: As células Vero são derivadas de rins de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em meio DMEM suplementado com 5 % SFB contendo penicilina/estreptomicina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa com 5 % de CO₂, a

37 °C. Estas células foram empregadas nos experimentos de citotoxicidade, de atividade antiviral contra os arbovírus ZIKV, CHIKV e MAYV.

Na tabela de número 1, as características das linhagens celulares estão apresentadas em uma forma resumida (origem histológica e ATCC®), também estão apresentadas as concentrações de plaqueamento utilizadas nos ensaios de citotoxicidade para as células MRC-5 e Vero, e de atividade antiviral, para a linhagem celular Vero, para este propósito foram empregadas microplacas de 96 poços.

Tabela 1 – Linhagens celulares utilizadas nos ensaios biológicos in vitro

| LINHAGEM CELULAR | ORIGEM HISTOLÓGICA | ATCC® | CONCENTRAÇÃO DE PLAQUEAMENTO (CÉLULAS/POÇO) |
|-------------------------|---------------------------|--------------|--|
| MRC-5 | Fibroblasto de pulmão | CCL-171™ | 1,0 x 10 ⁴ |
| Vero | Célula epitelial renal | CCL-81™ | 2,0 x 10 ⁴ |

4.1.13. Ensaio de citotoxicidade utilizando a técnica colorimétrica MTT

Utilizando microplacas de 96 poços, foi realizada a distribuição de suspensões de células MRC-5 e Vero, tendo o meio de cultura uma suplementação de 5% SFB. As placas foram incubadas em atmosfera úmida, a 5 % de CO₂, a 37 °C por 24 horas (MOSMANN, 1983a; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). Foram feitas oito diluições em série das amostras, solubilizadas anteriormente em DMSO, preparadas utilizando meio DMEM 1 % SFB. Os extratos e frações possuem concentrações que variam de 400 a 3,125 µg/mL, já as substâncias isoladas as concentrações variaram entre 100 e 0,78125 µg/mL. De acordo com (BRANDÃO et al., 2010) o volume de DMSO não deve exceder a concentração de 2%, logo o volume de amostras a ser utilizado levou isso em consideração em nossos cálculos.

Depois do desenvolvimento de uma monocamada celular na superfície dos poços de cada

placa, o meio de cultura foi retirado de cada poço com o intuito de deixar apenas a monocamada celular que está aderida, após foram adicionadas 100 µL das soluções diluídas das amostras e 100 µL de meio de cultura DMEM 1 % SFB, após procedeu-se a incubação das placas sob a mesma condição atmosférica. A solução de MTT [brometo de 3-(4',5'-dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol] (Sigma Aldrich®), preparada utilizando um tampão fosfato estéril (PBS) na concentração de 1,0 mg/mL, foi adicionada 120 minutos antes da realização das leituras (BRANDÃO et al., 2017; REIS et al., 2020a, 2020b, 2022)

Após 72h de tratamento foram realizadas as leituras utilizando um leitor de microplacas. Com isso conseguimos obter a quantidade de formazana obtida após a reação de redução do sal de tetrazólio (MTT) pelas células cultivadas. O aparelho leitor de placas utilizado foi o VICTOR™ X3 (Perkin Elmer®), o software de leitura utilizado foi o *WorkOut 2.5* realizando a leitura em comprimento de onda de 490 nm (BRANDÃO et al., 2017; REIS et al., 2020a, 2020b, 2022) A multiplicação celular da monocamada tratada foi comparada com controle celular.

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

Este experimento foi realizado com os seguintes controles:

Controle de DMSO: Este controle tem como objetivo demonstrar que mesmo os poços contendo meio de cultura com 1 % SFB e tratados com DMSO não interferem na atividade citotóxica da monocamada celular, ou seja, o DMSO aqui acrescentado, na mesma concentração aproximada da substância teste, não oferece risco citotóxico para as células comprovando que toda atividade citotóxica é resultado da substância.

Controle celular: A monocamada celular foi incubada apenas com meio de cultura suplementado com 1 % SFB demonstrando o comportamento das células sem qualquer tipo de tratamento que possa alterar de forma significativa o metabolismo ou outro aspecto durante o período de incubação. Assim, as células que se encontram nestes poços reservados podem ser utilizadas como padrão comparativo em relação aqueles em que foram submetidos a alguma atividade citotóxica.

4.1.14. Avaliação antiviral *in vitro*

4.1.15. Triagem da atividade antiviral pela técnica colorimétrica do MTT

A avaliação antiviral *in vitro* foi realizada seguindo a metodologia descrita por Brandão *et al.* (2010). Todas as amostras foram preparadas utilizando DMSO como solvente. As amostras foram testadas tendo em vista as concentrações não citotóxicas, resultados esses obtidos pelo teste anterior, as concentrações tem que ser inferior à concentração citotóxica a 50 % (CC₅₀).

As células foram cultivadas em placas de 96 poços de poliestireno de fundo chato (2,0 x 10⁴ células/cavidade). Após 24 horas de incubação em 5 % de CO₂, a 37 °C, assim como no teste de citotoxicidade o meio de cultura (DMEM 5 % SFB) foi removido e foram adicionados 100 µL das diluições das amostras, em cada poço, concomitantemente foi adicionado 100 µL da suspensão viral (título de 1,0 x 10³ TCID₅₀/mL, para o ZIKV; título de 1,0 x 10⁵ TCID₅₀/mL, para o CHIKV; título de 1,0 x 10⁶ TCID₅₀/mL, para o MAYV) (REIS *et al.*, 2020a, 2020b, 2022). Como próxima etapa, as placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, a 37 °C, por 72 horas. Os experimentos foram esquematizados, para melhor organização, da seguinte forma: controle de células não tratadas e infectadas (CV); controle de células tratadas e não infectadas (CT) e controle de células não tratadas e não infectadas (CC), em adição também da triplicata da atividade antiviral das amostras testes (células infectadas e tratadas). Em adição, tivemos o controle positivo para comparação, ribavirina ou amantadina (REIS *et al.*, 2020a, 2020b, 2022)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (MOSMANN, 1983b). Após a remoção de todo o conteúdo sobrenadante, foi pipetado em seguida, 28 µL de uma solução de MTT (1,0 mg/mL em PBS), em cada poço. As placas foram incubadas por 120 minutos a 37 °C e, após, foram adicionados 100 µL de DMSO, em cada poço, para dissolver os cristais de formazana, permitindo a leitura de sua concentração pelo leitor de placas. As placas foram mantidas sob agitação, em agitador de placas durante 15 minutos e a densidade óptica foi determinada em seguida nos comprimentos de onda de 490 nm (DO₄₉₀), no leitor de microplacas nm (BRANDÃO *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2020a, 2020b, 2022)

A concentração CE₅₀, ou seja, a concentração eficaz que apresenta 50 % de efeito antiviral. A CE₅₀ é a concentração que promove a proteção de 50 % das células tratadas, da destruição causada pelo vírus. A porcentagem de proteção é calculada como [(A-B)/C-B]x100, onde A, B e

C são as DO₄₉₀ das poços nas quais estão presentes células tratadas e infectadas (A), não tratadas e infectadas (B), e não tratadas e não infectadas (C), respectivamente.

Este experimento foi realizado com os seguintes controles:

Controle de citotoxicidade das amostras testadas: Poços contendo a monocamada celular foram simultaneamente pipetados com meio de cultura suplementado com 1 % SFB e as diluições das amostras nas concentrações idênticas as que foram utilizadas no ensaio antiviral. Este controle foi realizado para demonstrar que as amostras não possuem atividade citotóxica nas concentrações avaliadas.

Controle viral: A monocamada de células foi incubada com meio de cultura acrescido de 1 % SFB e de forma concomitante a suspensão de vírus, sem nenhum tratamento. O controle de vírus é utilizado como padrão de comparação para demonstrar o efeito citopático provocado pelo vírus.

Controle de vírus com DMSO: Poços contendo a monocamada celular foram pipetados com meio de cultura com 1 % SFB em conjunto com a suspensão de vírus, além de serem tratados com DMSO. Este controle demonstra que o solvente usado para solubilizar as amostras não apresenta atividade antiviral.

Controle celular: A monocamada de células foi incubada apenas com meio de cultura suplementado com 1 % SFB. Este controle avalia o comportamento das células sem que as mesmas tenham contato com qualquer interferente durante o período de incubação, sendo assim o padrão de controle para demonstrar como todas as células se comportam sem nenhum tipo de interferente.

Controle positivo: Os poços contendo a monocamada de célula foram acrescidos de meio de cultura suplementado com 1 % SFB, suspensão de vírus prosseguindo com o tratamento utilizando ribavirina, que já temos conhecimento sua atividade frente ao ZIKV (KAMIYAMA et al., 2017) e ao MAYV (FERRAZ et al., 2019). Para ensaios de atividade anti-CHIKV foi utilizada o princípio ativo amantadina, previamente descrito como ativo *in vitro* contra o CHIKV (DEY et al., 2019). O controle positivo tem uma função importante de apresentar um parâmetro de comparação das amostras testadas com uma atividade antiviral conhecida, também por conseguinte é demonstrativo sua atividade antiviral frente aos arbovírus.

4.1.16. Análise estatística dos dados

O método estatístico a utilizado foi o Teste t de *Student*, a análise de variância do pacote estatístico *GraphPad Prism*, versão 5.00, para avaliar diferenças entre as médias e medianas nos

ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral em comparação com os controles. Foi aceito para todos os testes o nível de significância de 5 %.

4.1.17. Determinação do Índice de Seletividade

Nos ensaios de atividade antiviral, o índice de seletividade das amostras a razão entre a sua concentração citotóxica média (CC₅₀), pela sua concentração efetiva média (CE₅₀), na linhagem celular Vero. Assim demonstra que a amostra tem a afinidade maior ao vírus, diminuindo sua replicação.

4.1.18. Perfis cromatográficos adquiridos através de RP-UPLC-DAD-MS

As análises por RP-UPLC-DAD-MS foram feitas empregando um sistema Nexera UHPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (maXis ETD high-resolution ESI-QTOF (Bruker)) tendo como software de controle *Compass 1.7* (Bruker). Utilizou-se uma coluna Shimadzu Shim-Pack XR-ODS-III (C18, 2.2µm, 2.0 x 150mm) com uma temperatura do forno de 40°C e fluxo da fase móvel de 400 µl/min. Os componentes da fase móvel utilizadas foram A (Água ultrapurificada acidificada a 0,1% de ácido fórmico) e B (Acetonitrila) a programação utilizada para eluição foi um gradiente inicial contendo 5% de B por 0,5 minutos e em seguindo um gradiente linear até 100% de acetonitrila no tempo de 10 minutos, após o gradiente de 100% ser atingido prosseguiu-se com o mesmo gradiente por 1,5 minutos.

| TEMPO (min) | H ₂ O (%) | ACN (%) |
|-------------|----------------------|---------|
| 0-0,5 | 95 | 5 |
| 0,5-10 | 5 | 100 |
| 10-11,5 | 100 | 100 |

Tabela 2: Gradiente de eluição empregado nas análises das frações por RP-UPLC-DAD-MS

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

5. Resultados e discussão:

5.1.1. Obtenção dos extratos e cálculos de rendimento:

O rendimento do extrato etanólico obtido por percolação a frio com etanol (92,8 GL) está representado na tabela abaixo:

Tabela 3: Rendimento para a formação do extrato etanólico

| Espécie | Parte utilizada | Massa do material vegetal seco (g) | Massa do extrato (g) | Rendimento (%) |
|----------------------|------------------------|---|-----------------------------|-----------------------|
| <i>Bidens Pilosa</i> | Planta inteira | 329,0 | 17,163 | 5,21 |

Tabela 4: Rendimento das frações feitas através do extrato etanólico

| Fração utilizada | Fração Obtida | Massa do extrato (g) | Rendimento (%) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | DCM | 4,242 | 24,71 |
| Extrato etanólico | AcOEt | 3,926 | 22,87 |
| | H ₂ O/MeOH | 8,198 | 47,76 |

5.2.1. Dados cromatográficos em cromatografia de camada delgada:

A Cromatografia em Camada Delgada (CCD) é uma técnica muito eficaz para a separação de constituintes químicos de um extrato e para sua identificação. A CCD é amplamente utilizada como ferramenta analítica para separação, identificação e estimativa de diferentes classes de produtos naturais. Devido ao fenômeno de adsorção os diferentes componentes são eluídos e separados pela migração do soluto entre duas fases - uma fase estacionária e uma fase móvel onde o componente de maior polaridade fica mais retido na sílica polar e o de menor polaridade tende a se deslocar junto à fase móvel. (WAGNER; BLADT, 1996)

Neste estudo a CCD foi de extrema importância, pois através dela foi possível ter um guia de como as frações estavam se formando e com isso identificar quais seriam os possíveis grupos moleculares, com base em polaridade, estavam presentes em cada fração.

5.2.2. Prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Bidens pilosa*:

5.2.3. Detecção de geninas flavônicas



Figura 1: Perfis em CCD da pesquisa de geninas flavônicas do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa*. Eluente: clorofórmio - acetato de etila (60:40). Revelador NP/PEG. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico semi-purificado e o extrato etanólico bruto e à direita o padrão de quercetina. UV₃₆₅ nm.

5.2.4. Detecção de heterosídeos flavônicos



Figura 2: Perfis em CCD da pesquisa de heterosídeos flavônicos do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa*. Eluente: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético – água (100:11:11:27) Revelador NP/PEG. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de rutina. UV₃₆₅ nm.

5.2.5. Detecção de geninas antraquinônicas



Figura 3: Perfis em CCD da pesquisa de geninas antraquinônicas do extrato etanólico da planta inteira de Bidens pilosa Eluente: tolueno – acetona – clorofórmio (40:5:35) Revelador: KOH 5%. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de 1,8-di-hidróxi-antraquinona UV₃₆₅ nm.

5.2.6. Detecção de heterosídeos antracênicos

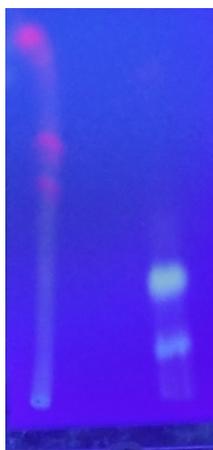


Figura 4: Perfis em CCD da pesquisa de heterosídeos antracênicos do extrato etanólico da planta inteira de Bidens pilosa Eluente: acetato de etila – metanol – água (81:11:8) KOH 5%. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de aloína UV₃₆₅ nm.

5.2.7. Detecção de triterpenos e esteróides

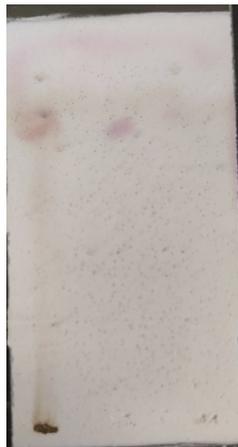


Figura 5: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: hexano – acetato de etila (40:20) Revelador LB. Onde novamente à esquerda temos o extrato bruto e à direita temos o β -sitosterol (esteróide) e depois ácido oleanóico (triterpeno).

5.2.8. Detecção de cumarinas

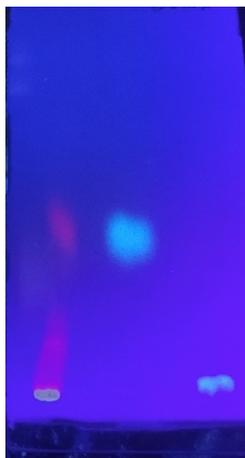


Figura 6: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: tolueno – éter saturado com 5 gotas de ácido acético (80: 20) Revelador: KOH 5%. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de cumarina e escopoletina UV₃₆₅ nm

5.2.9. Detecção de saponinas

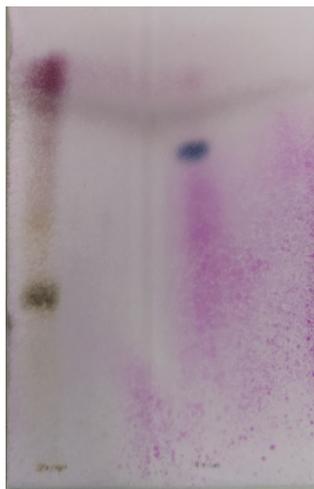


Figura 7: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: clorofórmio – ácido acético glacial - metanol – água (15:8:3:2) Revelador Anisaldeído Sulfúrico. Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de Digitonina

5.2.10. Detecção de alcaloides



Figura 8: Perfis em CCD da pesquisa de triterpenos e esteróides do extrato etanólico da planta inteira de *Bidens pilosa* Eluente: acetato de etila – ácido fórmico – ácido acético - água – etilmetilcetona (50:7:3:10:30) reagente de Dragendorff Onde da esquerda para a direita temos o extrato etanólico e à direita o padrão de Erythrina

| Classes Fitoquímicas | Resultado encontrado |
|----------------------|----------------------|
| Alcaloides | - |

| | |
|-----------------------------------|---|
| Cumarinas | + |
| Geninas Flavônicas | + |
| Geninas Antraquinônicas | - |
| Heterosídeos Antracênicos | - |
| Heterosídeos Cardiotônicos | - |
| Heterosídeos Flavônicos | - |
| Saponinas | - |
| Triterpenos | + |

Tabela 5: Resultado da prospecção fitoquímica (CCD) do extrato etanólico.

Legenda: (-) ausência, (+) presença.

Os resultados obtidos no presente estudo foram condizentes com a literatura (LUCCHETTI et al., 2009), confirmando a presença dos componentes clássicos desta espécie, dentre eles a presença de Cumarinas, Triterpenos e Geninas flavônicas.

4.2 Ensaio Biológicos:

4.2.1 Avaliação da atividade citotóxica do extrato etanólico e frações

O método colorimétrico utilizando MTT - é um ensaio que mede a citotoxicidade das amostras desejadas através da transformação catalisada pelas enzimas mitocondriais succinato-desidrogenases, onde elas clivam o anel tetrazólio do sal de tetrazólio, o brometo de 3 - (4',5' - dimetiltiazol-2' - ila) - 2,5-difeniltetrazol (MTT), que possui coloração amarela e é hidrossolúvel, em um precipitado azul-violeta insolúvel em meio aquoso, denominado de formazana. (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983b; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987)

Foi realizada a citotoxicidade do extrato da planta completa (*B. Pilosa*) e suas respectivas frações, DCM (Diclorometano), Acetato de etila (AcOEt) e hidrometanólica (H₂O). Além das frações majoritárias fizemos também a atividade citotóxica das frações derivadas do refração da fração AcOEt (racionadas empregando a resina de Sephadex LH-20). A atividade citotóxica foi

realizada empregando as linhagens de célula Vero (derivadas de rins de macaco verde africano) e MRC-5 (derivada de tecido pulmonar normal de humano).

Para isso todas as 11 amostras foram solubilizadas em DMSO utilizando as concentrações de 20 mg/mL para o extrato bruto e as frações DCM, AcOEt e H₂O, e 10mg/mL para as frações refracionadas da fração AcOEt sendo feitas oito diluições seriadas em concentrações que variam de 400 a 3,125 µg/mL para os extratos e frações. Os resultados das CC₅₀ foram representados na tabela 5:

| SUBSTÂNCIA | MRC-5 CC ₅₀ µg.mL ⁻¹ | VERO CC ₅₀ µg.mL ⁻¹ |
|--|---|--|
| <i>B. pilosa</i> – Planta inteira | > 400,00 | 280,10 ± 1,66 |
| F. DCM – <i>B. pilosa</i> | > 400,00 | 353,30 ± 1,91 |
| F. AcOEt – <i>B. pilosa</i> | > 400,00 | > 400,00 |
| F. H ₂ O – <i>B. pilosa</i> | > 400,00 | > 400,00 |
| Fr. 01 – 16 (GV01) | > 100,00 | > 100,00 |
| Fr. 17 – 19 (GV02) | > 100,00 | > 100,00 |
| Fr. 28 – 33 (GV03) | > 100,00 | 79,09 ± 1,45 |
| Fr. 34 – 40 (GV04) | > 100,00 | > 100,00 |
| Fr. 45 – 47 (GV05) | > 100,00 | 86,40 ± 1,33 |
| Fr. 48 – 51 (GV06) | > 100,00 | 55,17 ± 1,29 |
| Fr. 49 – 56 (GV07) | > 100,00 | NT |
| Ribavirina | 52,66 ± 1,18 | 370,40 ± 1,20 |
| (Controle positivo) | (215,65 ± 1,18 µM) | (1516,75 ± 1,20 µM) |
| Amantadina | 246,20 ± 1,44 | 84,89 ± 1,16 |
| (Controle positivo) | (1627,77 ± 1,44 µM) | (561,26 ± 1,16 µM) |

Tabela 5: Atividade citotóxica (CC₅₀) dos extratos e frações nas células MRC-5 e Vero

NT = não testado

As frações obtidos do extrato de *B. pilosa* foram relativamente (em comparação com o controle ribavirina) de baixa citotoxicidade, resultados que são reforçados por (MEDEIROS, 2013) mostrando que tanto *in vivo* quanto *in vitro* que os componentes da planta não apresentam alta toxicidade.

Em nosso trabalho também foi possível analisar que os componentes mais apolares são mais citotóxicos que os mais polares, resultado que está em consonância com (KVIECINSKI, 2013) que comprovou em seus testes que os componentes mais apolares apresentam maior

citotoxicidade, uma vez que a fração clorofórmio foi a mais citotóxica em seu trabalho. Porém de modo geral as substâncias da planta não apresentam alta citotoxicidade.

4.2.2 Avaliação atividade antiviral

Após o teste de citotoxicidade foram escolhidas oito concentrações não citotóxicas e realizou-se os ensaios tratando as células Vero infectadas com ZIKV, CHIKV e MAYV. Os resultados da concentração efetiva a 50% (CE₅₀ -concentração da substância capaz de reduzir o efeito citopático viral em 50%) para o extrato etanólico e as frações constam da Tabela 5.

O extrato etanólico apresentou atividade contra todos os três vírus testados com CE₅₀ variando entre 84,71 a 182,30 µg.mL⁻¹. O melhor resultado foi obtido contra o ZIKV com CE₅₀ de 84,71 µg.mL⁻¹. O fracionamento inicial não melhorou a atividade antiviral apesar da fração em acetato de etila manter a atividade contra os três vírus do estudo. O refractionamento da fração em acetato de etila levou à formação de 2 frações com atividade antiviral uma denominada GV05 e outra GV07. A fração GV 05 apresentou bons resultados contra o MAYV, porém obtivemos um baixo índice de seletividade sendo a mesma considerada citotóxica, e tivemos também a GV07 apresentou melhor a atividade antiviral contra o ZIKV e MAYV em comparação com o extrato de origem apresentando CE₅₀ de 45,53 e 27,58 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Vale ressaltar que apesar de a planta já ter apresentado resultados antivirais contra o vírus do herpes, citomegalovírus e o vírus Sindbis (BRASIL, 2015), seus resultados frente a arbovírus são inéditos e significantes. Tendo em vista também que são frações, caso mais estudos sejam realizados, é possível uma melhora de resultados obtendo frações mais purificadas.

Tabela 6: Avaliação da atividade antiviral (CE₅₀) frente aos vírus: Zika virus (ZIKV), Chikungunya virus (CHIKV) e Mayaro virus (MAYV), em linhagem celular VERO, com respectivos desvios padrões (n=3) e índice de seletividade (IS), dos extratos, frações e substâncias isoladas da espécie *B. pilosa*.

| SUBSTÂNCIA | ZIKV ^a | IS ^b | CHIKV ^c | IS | MAYV ^d | IS ² |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|---|--------|--------------------------------------|-----------------|
| – | CE ₅₀ µg.mL ⁻¹ | – | CE ₅₀ µg.mL ⁻¹ ₁ | – | CE ₅₀ µg.mL ⁻¹ | – |
| Extrato etanólico | 84,71 ± 3,08 | 3,31 | 182,30 ± 5,31 | 1,54 | 145,80 ± 2,85 | 1,92 |
| F. DCM | 185,60 ± 4,73 | 1,9 | NA e | – | NA | – |
| F. AcOEt | 150,80 ± 2,20 | > 2,65 | 265,30 ± 1,54 | > 1,51 | 176,50 ± 1,97 | > 2,27 |
| F. MeOH/H ₂ O | NA | – | NA | – | NA | – |
| Fr. 01 – 16 (GV01) | NA | – | NA | – | NA | – |
| Fr. 17 – 19 (GV02) | NA | – | NA | – | NA | – |
| Fr. 28 – 33 (GV03) | NA | – | NA | – | NA | – |
| Fr. 34 – 40 (GV04) | NA | – | NA | – | NA | – |
| Fr. 45 – 47 (GV05) | NA | – | NA | – | 70,47 ± 3,77 | 1,23 |
| Fr. 48 – 51 (GV06) | NA | – | NA | – | NA | – |
| Fr. 49 – 56 (GV07) | 45,53 ± 1,93 | – | NT | – | 27,58 ± 2,82 | – |
| Ribavirina (Controle positivo) | 94,47 ± 2,70 | 3,92 | NA | – | 29,21 ± 1,39 | 12,68 |
| Amantadina (Controle positivo) | NT ^g | – | 63,37 ± 1,70 | 1,34 | NT | – |

^a ZIKV: Título viral 1x10³ TCID₅₀/mL; ^b IS (Índice de seletividade) = CC₅₀(Vero)/EC₅₀(Vero); ^c CHIKV: Título viral 1x10⁷ TCID₅₀/mL; ^d MAYV: Título viral 1x10⁴ TCID₅₀/mL; ^e NA: Não ativo; ^f –: Não determinado; ^g: Não testado.

5 Componentes identificáveis no extrato e frações de *Bidens pilosa*

Extratos de plantas são matrizes complexas compostas por diferentes tipos de metabólitos bioativos. O isolamento destes constituintes são muitas vezes difíceis e dispendioso o que leva a busca de por técnicas físico-químicas que permitem a caracterização dos mesmos sem um isolamento prévio. Sendo assim, no presente estudo foi utilizado a cromatografia líquida de ultra performance (CLUE) utilizando uma coluna de fase reversa (C18, *Reverse Phase*) acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLUE-DAD) e/ ou espectrometria de massa (CLUE-EM).

A CLAE assim como a CLUE com fase reversa utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados. Estes tipos de cromatografia líquida que empregam colunas fechadas contendo materiais preparados para receber uma fase móvel simples ou complexa que

é eluída empregando altas pressões, sendo a CLUE a metodologia que emprega uma pressão ainda maior que a CLAE, com isso possibilitando a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos presentes em amostras variadas, reduzindo o tempo para uma escala de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Além de permitir excelente separação, esta técnica possibilita simultaneamente separar, identificar e quantificar metabólitos secundários sem requerer purificação excessiva dos extratos (ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA; RIVAS-GONZALO, 2004).

A utilização de um arranjo de diodos (DAD) é crucial para o rastreamento de compostos bioativos, uma vez que muitos destes metabólitos apresentam absorção de energia que permite sua identificação através de espectros utilizando UV-vis característicos. No entanto, o número de padrões disponíveis comercialmente é relativamente pequeno quando comparada com a grande diversidade de estruturas na natureza, limitando assim o sucesso da CLUE-DAD. Porém apenas um tipo de identificação não é o suficiente para ter uma boa identificação de amostras extremamente complexas como as amostras de extrato bruto de uma planta inteira, logo, vê se a necessidade da utilização de uma forma a mais de identificação, como por exemplo a espectrometria de massas que pode informar com alta precisão a massa dos componentes que passam por ela, informando também suas clivagens moleculares, possibilitando uma certa previsão do tipo de moléculas presentes nas amostras. Este tipo de metodologia para identificação de compostos naturais também é amplamente utilizado por nosso grupo de pesquisa confirmando sua eficiência (REIS et al., 2020a, 2020b, 2022)

Analisando o perfil cromatográfico da fração AcOEt e da sub fração GV-07, feito por UPLC-RP-DAD-MS, foi possível a identificação e confirmação da presença de diversos constituintes químicos, dentre eles flavonoides que possivelmente são os responsáveis pela atividade antiviral. A técnica conjunta CLUE-EM foi utilizada para obter íons moleculares e fragmentos característicos. Estudos detalhados de fragmentação foram realizados na tentativa de identificação dos constituintes presentes nos extratos da espécie em estudo, bem como por comparação com dados previamente publicados na literatura.

5.2.1 Perfil cromatográfico da fração em acetato de etila e fração GV-07

Foi obtido o perfil cromatográfico da fração em acetato de etila, na concentração de 10mg/mL e o cromatograma está apresentado na **Figura 10**.

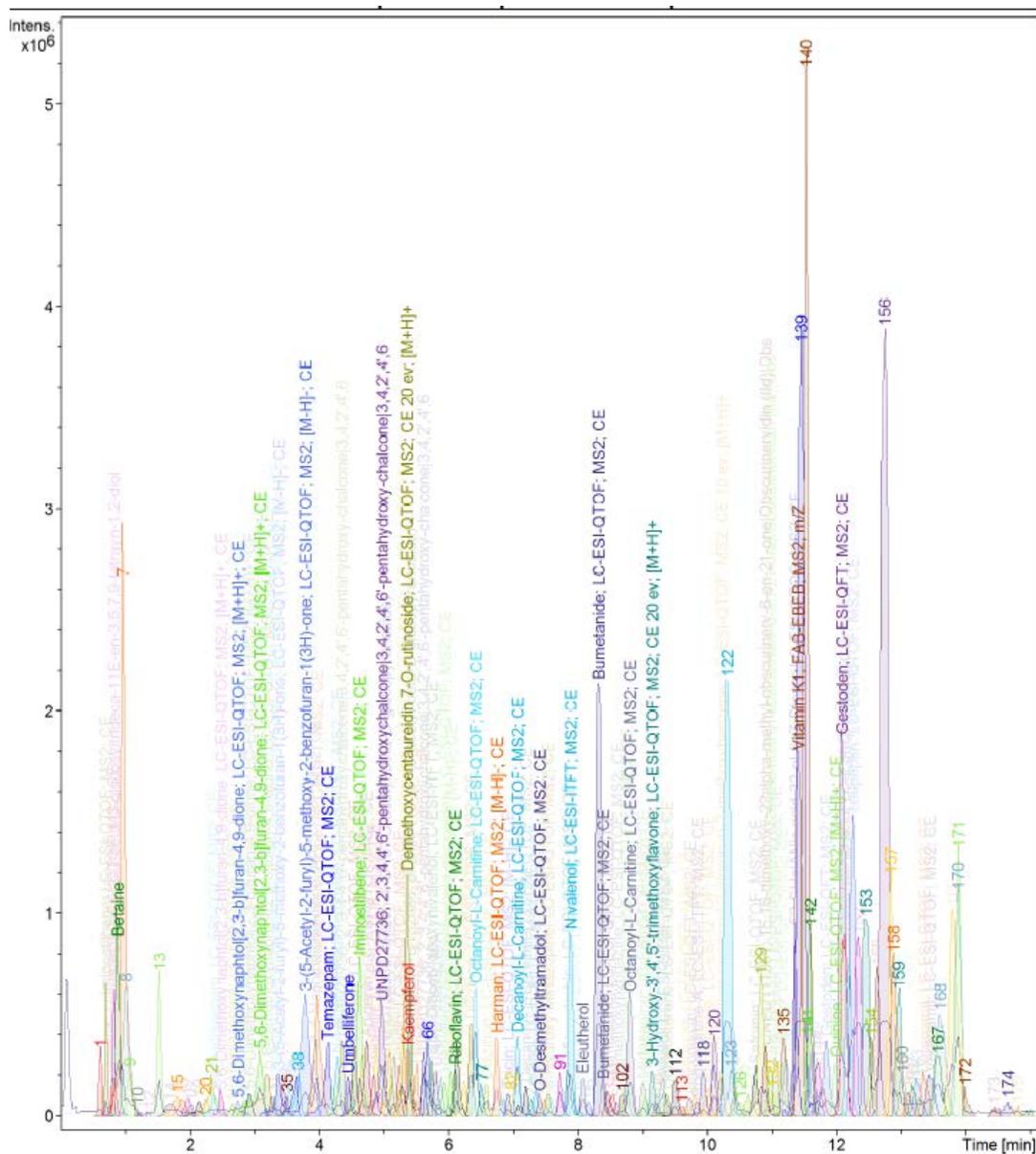


Figura 9: Perfil cromatográfico da fração AcOEt

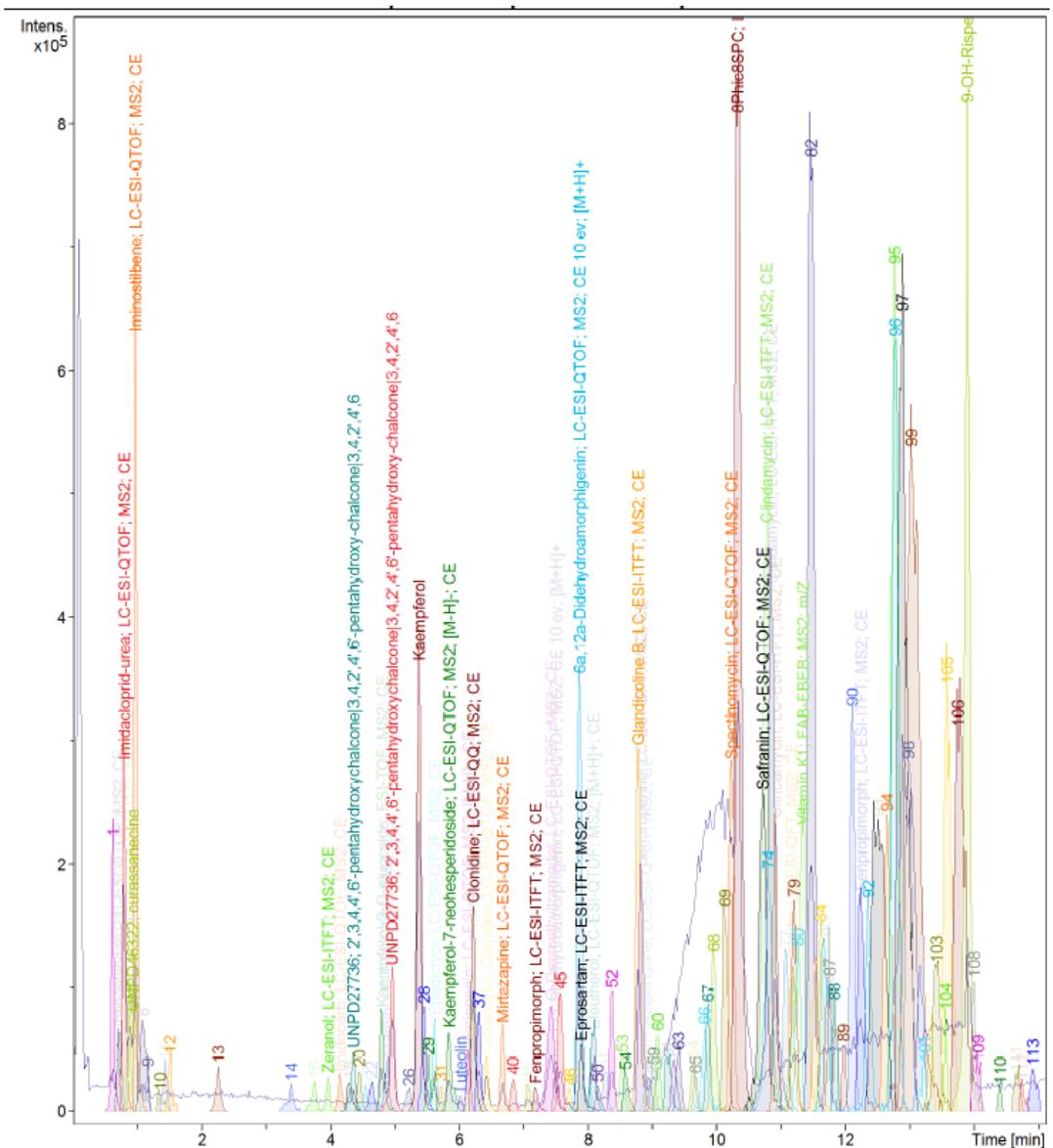


Figura 10: Perfil cromatográfico fração GV-07

Por meio da espectroscopia no UV/VIS de flavonoides dissolvidos em metanol é possível realizar uma determinação estrutural simples. Segundo (MABRY, T.J.; MARKHAM; THOMAS, 1970) alguns espectros característicos como as de flavonas e flavonóis apresentando duas absorvâncias distintas na região de 240-400 nm. Esses dois picos são designados comumente como banda I (usualmente de 300-380 nm) e banda II (usualmente em 240-280 nm). A banda I está associada com a absorção devida ao sistema cinamoila do anel B, e a banda II com a absorção envolvendo o sistema benzóila do anel A (**figura 12**). Flavonas e flavonóis oxigenados no anel A,

mas não no B, tendem a ter a banda II mais pronunciada que a I. Em moléculas que também possuem o anel B oxigenado, o espectro apresenta a banda I mais pronunciada, a qual aparece em comprimentos de onda não muito distantes.

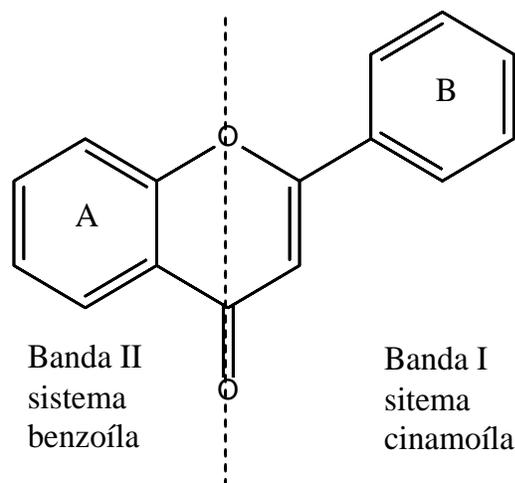


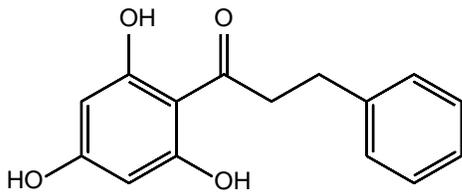
Figura 112: Sistemas de absorção em UV-VIS do núcleo aromático dos flavonoides.

Analisando o espectro obtido em metanol, a posição da Banda I fornece informações sobre o tipo de flavonoide assim como o seu padrão de oxidação (MARKHAM, 1982). A banda I das flavonas ocorre na faixa de 304-350 nm, enquanto que a dos flavonóis aparece em 352-385 nm. Quanto maior a oxidação do anel B, maior o deslocamento batocrômico da banda I. Esses efeitos também podem ser observados para a banda II para flavonas e flavonóis, quanto maior o padrão de oxigenação no anel A, maior o deslocamento batocrômico da banda II.

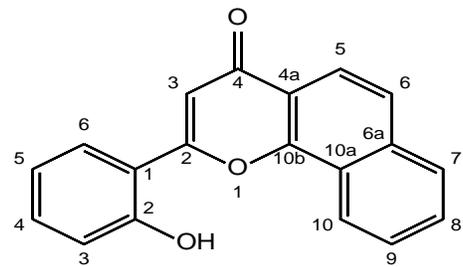
Com as informações de UV/VIS, associado em conjunto com as massas e fragmentos obtidos, um banco de dados público contendo espectros de variadas substâncias e o artigo de revisão realizado por (XUAN; KHANH, 2016) tivemos como associar os dados obtidas através da espectroscopia de massas a substâncias previamente isoladas desta espécie, propondo assim os prováveis componentes que as amostras continham.

Tabela 7: Flavonoides identificados na fração em acetato de etila

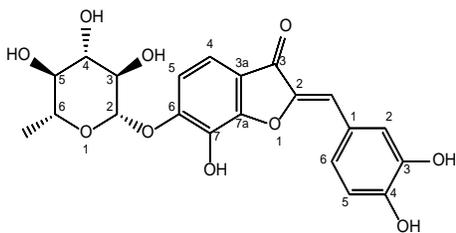
| | Substância | [M + H]⁺ | Tr | Fragmentos |
|----|--|----------------------------|-----------|---|
| 1 | 2',4',6'-Trihidroxidihidrochalcona | 259,0784 | 2,7 | 259,0784; 153,9553 |
| 2 | 2'-Hydroxy- α -naftoflavona | 289,0889 | 3,3 | 289,0889; 287,0730; 127,0390 |
| 3 | (Z)-6-O- β -D-Glicopiranosil-6,7,3',4'-tetrahydroxaurona | 433,1321 | 4,1 | 127,0389; 433,1321; 431.1160 |
| 4 | 3',4',5,7-tetrahydroxyflavanona | 289,0701 | 4,3 | 289,0701; 163.0390; 153.0182; 135.043 |
| 5 | Naringenina | 273,0750 | 4,7 | 273.0750; 271.0783; 216.0630; 153.0172; 147.0436 |
| 6 | Sulfuretina | 271,0784 | 4,7 | 271.0784; 211.0575; 155.031; 147,0654 |
| 7 | Maritimetina | 287,0547 | 4,8 | 287,0547; 163.0385; 161.0238; 153.017; 135,0431; 127,0396 |
| 8 | Isookanina-7-O-glicosideo | 451,1230 | 4,9 | 451.122; 289,0702; 163,0389; 153,0181 |
| 9 | Eriodictiol | 289,0702 | 4,9 | 289.0703;163.0390;153.0182 |
| 10 | Okanina 4'-O- β -D-(6''-O-acetilglucosideo) | 493.1334 | 4,9 | 289.0708; 271,0603; 163,0389; 153,0180 |
| 11 | Campferol-4'-metoxi-O-rutinosideo | 609,1889 | 5,1 | 609.1813; 463.1224; 301.0701; 163.038 |
| 12 | Quercetina-3,4'-dimetil eter-7-O-rutinosideo | 639,1911 | 5,3 | 639.1905; 493,1332; 331,0807 |
| 13 | Campferol | 287,0544 | 5,4 | 287,0547; 261,0228; 153,0181 |
| 14 | Okanina 4'-O- β -D-(6''-O-acetylglucosideo) | 493.1333 | 5,4 | 493.1328; 289.0702; 163.0388; 153.0180 |
| 15 | Hesperetina | 303,0855 | 5,5 | 303,0859;177.0540;163.0383;153.0182 |
| 16 | Okanina | 289,0701 | 5,6 | 289.0703;163.0388;153.0181 |
| 17 | 2',4'-dihidroxichalcona | 241,0678 | 5,6 | 241,0679; 181,0472; 159,0646 |
| 18 | Okanina 4'-O- β -D-(6''-trans-p-coumaroil)-glucosideo | 597,1593 | 5,7 | 597,1620; 309,0964; 289,0705; 147,0439 |
| 19 | 4'',5',6'-trihidroxichalcona-4'-O- β -D-(6''-acetylglucosideo) | 477,1382 | 5,8 | 477,1378; 273,0752; 205,0707; 153.0179; 147.0439 |
| 20 | Okanina-4'-O- β -D-(3'',6''-diacetil)-glucopiranosideo | 535,1435 | 6,0 | 535,1444; 289,0703; 179,0340; 163,0390; 153,0178; 127,0390 |
| 21 | Okanina-4-metoxi-1'-O- β -D-(6''-acetylglucosideo) | 507.1489 | 6,1 | 507.1489; 303,0857; 177.0546;153.0185 |
| 22 | 4',4''5',6', -tetrahidroxichalcona | 273.0753 | 6,2 | 273.0752;153.0179;147.0439 |



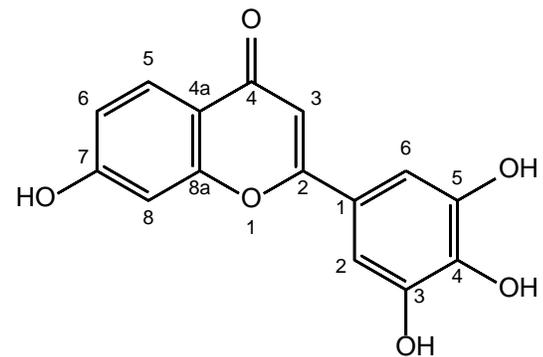
Composto 1: 2',4',6'-Trihidroxiidrochalcona



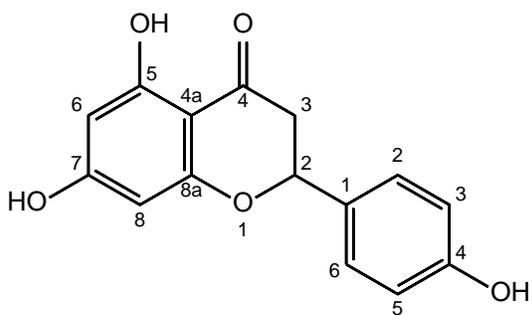
Composto 2: 2'-Hidroxi- α -naftoflavona



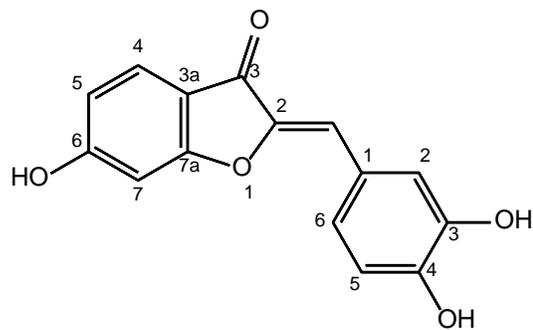
Composto 3: (Z)-6-O- β -D-Glucopiranosil-6,7,3',4'-tetrahydroxiaurona



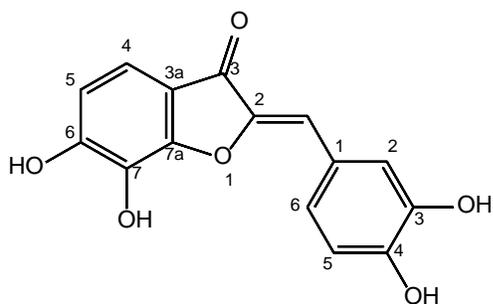
Composto 4: 3',4',5',7-tetrahydroxiflavanona



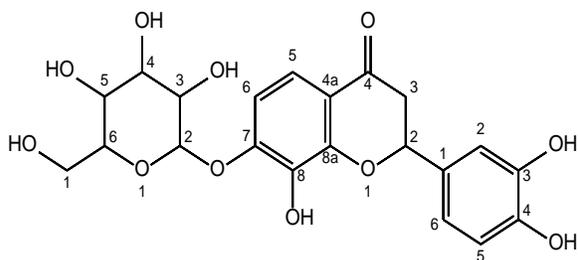
Composto 5: Naringenina



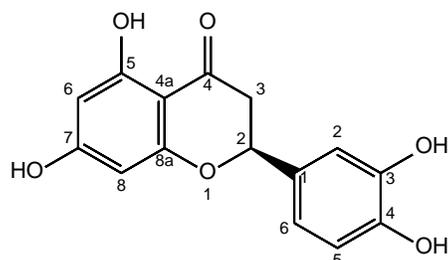
Composto 6: Sulfuretina



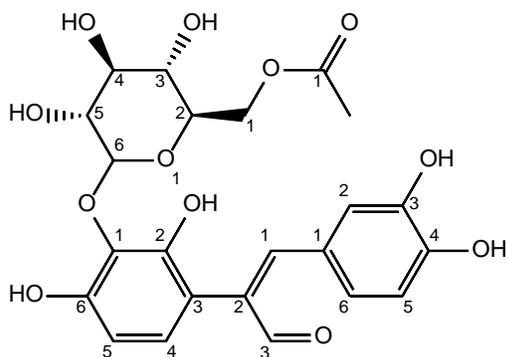
Composto 7: (2Z)-2-(3,4-Dihidroxi-benzilideno)-6,7-dihidroxi-1-benzofuran-3(2H)-ona



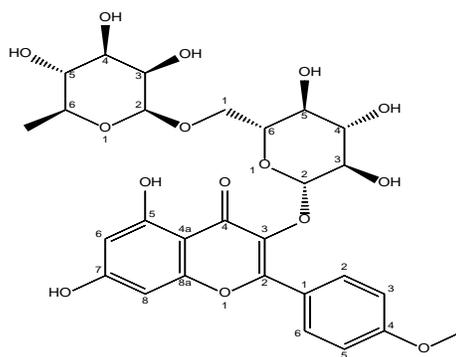
Composto 8: Isookanina-7-O-glicosideo



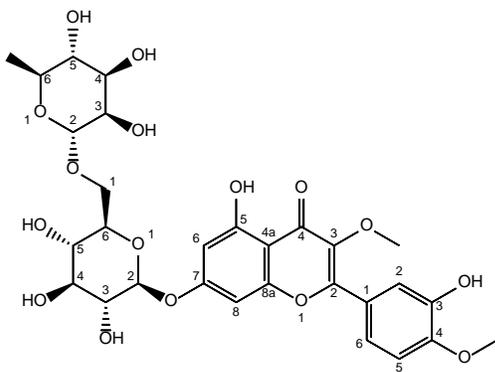
Composto 9: Eriodictiol



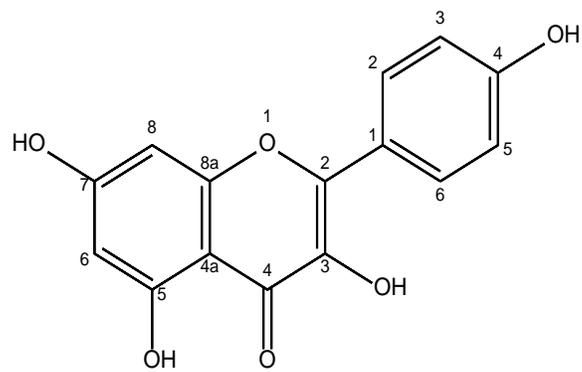
Composto 10: Okanina 4'-O-β-D-(6''-O-acetilglucosideo)



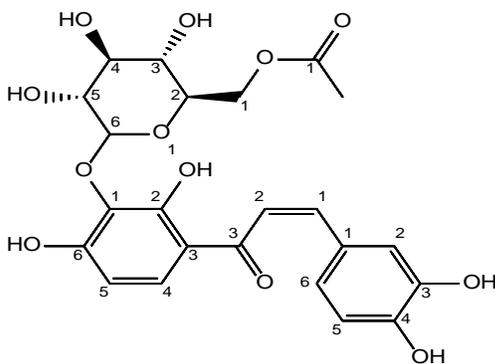
Composto 11: 4'-metoxi-campferol-O-rutinosideo



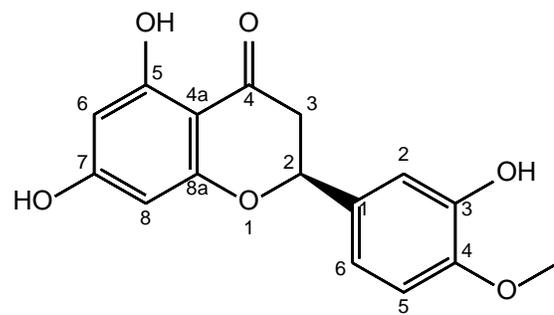
Composto 12: Quercetina-3,4'-dimetil eter-7-O-rutinosideo



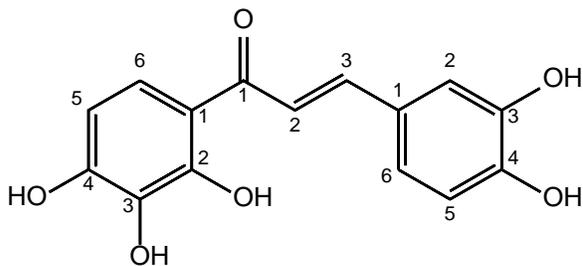
Composto 13: Campferol



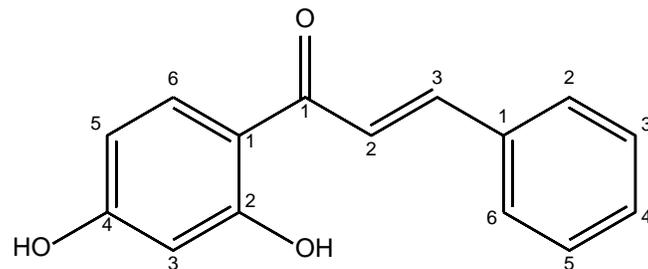
Composto 14: Okanina 1'-O- β -D-(6''-O-acetilglucosideo)



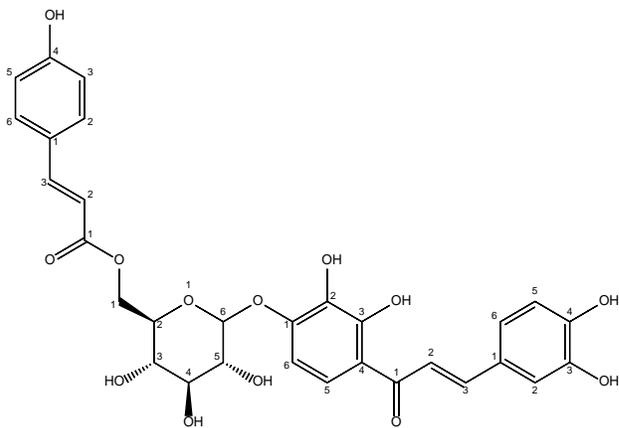
Composto 15: (-)-hesperetina



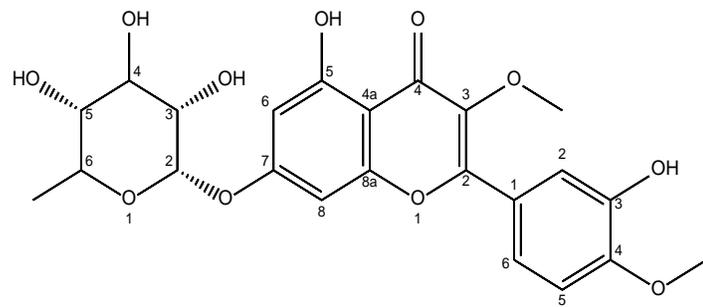
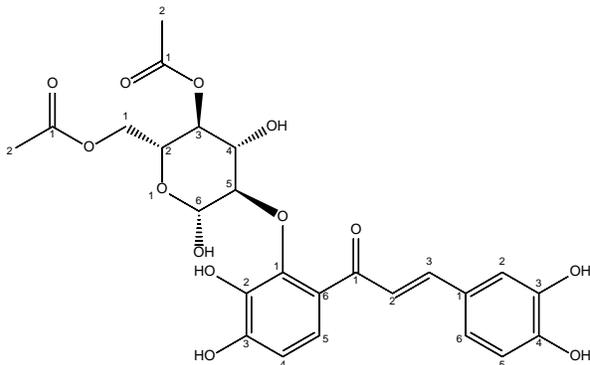
Composto 16: Okanina



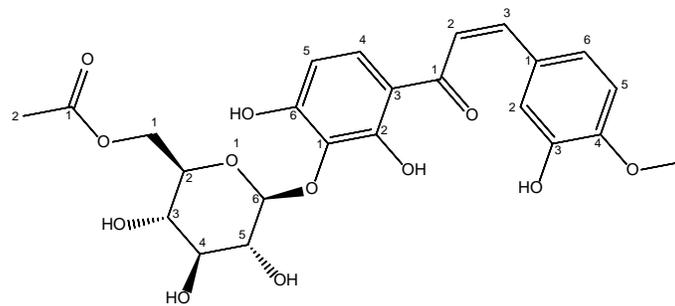
Composto 17: 2',4'-dihidroxicalcona



Composto 18: Okanina 4'-O- β -D-(6''-trans-p-coumaroil)-glucosideo

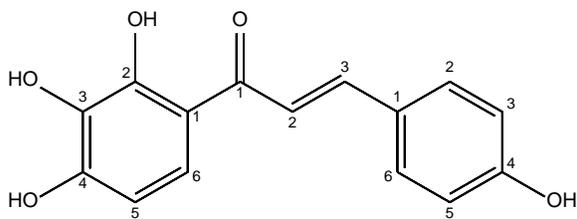


Composto 19: 4'',5,6-trihidroxicalcona-4'-O- β -D-(6''-acetylglucosideo)



Composto 21: Okanina-4-metoksi-1'-O- β -D-(6''-acetylglucosideo)

Composto 20: Okanina-4'-O- β -D-(3'',6''-diacetyl)-glucopiranosideo



Composto 22: 4',4,5,6, tetrahidroxichalcona

6 Conclusão

Extrato e frações da espécie *Bidens pilosa* mostram ser potenciais fontes de substâncias com atividade anti-arbovírus e como em nosso estudo demonstramos que ele apresentou suas atividades em mais de uma espécie, isto indica que podemos ter mais atividade em outros arbovírus, abrindo um novo grande leque de possibilidades e incentivos de novos estudos sobre esta área. Próximas etapas de purificação poderiam possibilitar um aumento de sua atividade e uma melhor seletividade, assim possibilitando também um melhor estudo e uma análise aprofundada sobre os mecanismos de ação e quais são os componentes químicos responsáveis pela atividade antiviral dos extratos aqui apresentados. Apesar de análises cromatográficas por CCD em sílica gel e por CLUE-DAD-EM de alta resolução permitem sugerir que constituintes fenólicos como flavonoides são os principais componentes do extrato e frações analisados no presente estudo ainda temos muitos mais estudos a serem realizados sobre como podemos avançar nesta área. Ressaltando também que por ser uma planta de fácil acesso e de amplo crescimento pelo país, caso venhamos a utilizar os componentes desta planta como medicamento sua extração muito provavelmente não seria tão cara, apresentando assim uma grande fonte de medicamentos de forma barata e podendo ajudar grande parte da população carente de nosso país.

7 Referências

- ALLARD, P.-M. et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, mar. 2016.
- BADRI, M.; DISSANAYAKE, D. M. R. D.; KAO, F. F. The promotion and development of traditional medicine. **World Health Organization - Technical Report Series**, v. NO. 622, 1978.
- BAUER, R.; REDL, K.; DAVIS, B. Four polyacetylene glucosides from *Bidens campylothea*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2035–2037, 1 jun. 1992.
- BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part 1. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469–476, 2010.
- BRANDÃO, G. C. et al. Antiviral Activity of *Fridericia formosa* (Bureau) L. G. Lohmann (Bignoniaceae) Extracts and Constituents. **Journal of tropical medicine**, v. 2017, p. 6106959, 2017.
- BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. [s.l.] Departamento de atenção básica, 2006.
- BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 1. ed. [s.l.] Ministério da Saúde, 2009. v. 1
- BRASIL. **MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Bidens pilosa* (Picão – preto)**. 1. ed. [s.l.] Ministério da Saúde, 2015.
- BRASIL. **Vírus Zika no Brasil: A resposta do SUS**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. v. 1
- CALIXTO, J. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. cult. (São Paulo)**, v. 55, n. 3, p. 37–39, 2003.
- CAMPBELL, G. et al. Allelopathic properties of α -terthienyl and phenylheptatriyne, naturally occurring compounds from species of asteraceae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, n. 6, p. 961–972, 1982.

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

DEY, D. et al. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007548, jul. 2019.

DONALISIO, M. R.; RICARDO RIBAS FREITAS, A. **Um desafio emergente** *Revista Brasileira de Epidemiologia* Associação Brasileira de Pos, Graduação em Saúde Coletiva, , 2015.

ESMOT. Fitoterapia Chinesa. **ESMOT - Escola de Medicina Oriental e Terapêuticas**, p. 1–6, 2015.

FERRAZ, A. C. et al. Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral research**, v. 168, p. 76–81, ago. 2019.

GRANDI, T. S. M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 3, n. 2 suppl 1, p. 185–224, 1989.

HARRI LORENZI. **Plantas Daninhas do Brasil - terrestre, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000.

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

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

KVIECINSKI, M. R. Atividade antitumoral de extratos de *bidens pilosa* linné ricos em poliacetilenos e de juglona associada ao ascorbato. 2013.

LAERTE PINTO JUNIOR, V. et al. **Vírus Zika: Revisão para Clínicos Zika Virus: A Review to Clinicians**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.actamedicaportuguesa.com>.

LOPES, N. et al. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil General features and epidemiology of emerging arboviruses in Brazil Características generales y epidemiología de los arbovirus emergentes en Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.

LUCCHETTI, L. et al. **Bidens pilosa L. (Asteraceae)** *Revista Fitos*. [s.l.: s.n.].

LUCIA, A. N. A.; ESCOBAR, S.; XAVIER, F. B. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. **Revista UNINGÁ**, v. 37, p. 159–172, 2013.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic Identification of Flavonoids**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1970.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London; New York: Academic Press, 1982.

MEDEIROS, T. L. DE. Avaliação das atividades antimalárica e antitoxoplasma dos compostos complexados obtidos da *Bidens pilosa* (Asteraceae). 2013.

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

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

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014**. **Journal Of Natural Products**, v. 79, n. 3, p.629-661, 2016.

REIS, A. C. C. et al. Antiviral activity and chemical characterization of *Cissus erosa* (Vitaceae) ethanol extracts. **Rodriguesia**, v. 7, 1 jul. 2020a.

REIS, A. C. C. et al. Anti-Zika virus activity and chemical characterization by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC-DAD-UV-MS) of ethanol extracts in *Tecoma* species. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, 7 ago. 2020b.

REIS, A. C. C. et al. Anti-arboviral activity and chemical characterization of hispidulin and ethanolic extracts from *Millingtonia hortensis* L.f. and *Oroxylum indicum* (L.) Kurz (Bignoniaceae). **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–5, 2022.

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

RIVERA, D.; OBÓN, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 2, p. 73–93, 1 maio 1995.

SUZIGAN, M. I. et al. An aqueous extract of *Bidens pilosa* L. protects liver from cholestatic disease: experimental study in young rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 5, p. 347–352, set. 2009.

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

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2nd. ed. Berlin: Springer Science & Business Media, 1996, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. **World Health Organization (WHO)**, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The promotion and development of traditional medicine. **World Health Organization (WHO)**, 1978.

XUAN, T. D.; KHANH, T. D. Chemistry and pharmacology of *Bidens pilosa*: an overview. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 2, p. 91–132, 2016.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.