

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIVIRAL SOBRE SARS COV-2 DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NAS FOLHAS DO EXTRATO BRUTO DE *EUGENIA PYRIFORMIS*

Juliana Aparecida Mendonça¹
Isabelle Luiz Rahal²
Gabriela Catuzo Canônico Silva³
Zilda Cristiani Gazim⁴
Daniela Dib Gonçalves⁵
Adriane Cordeiro Trevisani⁶
Bruna de Fatima Antunes Laginestra⁷
Larissa Rafaela de Paula Ferreira⁸
Ranulfo Piau Junior⁹

MENDONÇA, J. A.; RAHAL, I. L.; SILVA, G. C. C.; GAZIM, Z. C.; GONÇALVES, D. D.; TREVISANI, A. C.; LAGINESTRA, B. de. F. A.; FERREIRA, L. R. de. P.; JUNIOR, R. P. Estudo do potencial antiviral sobre Sars Cov-2 dos compostos identificados nas folhas do extrato bruto de *Eugenia pyriformis*. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama. v. 26, n. 3, p. 1091-1098, set./dez. 2022.

RESUMO: *Eugenia pyriformis* Cambess (Myrtaceae), conhecida popularmente como uvaia. Em seus frutos são encontrados compostos fenólicos com ação antioxidante e nas folhas foram detectados altos teores de flavonoides e taninos hidrolisados que se mostraram inibidor da protease de 2019 - nCoV e SARS-CoV. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi a obtenção do extrato bruto das folhas, a análise da composição química e a possibilidade da ação antiviral frente ao SARS COV-2. O extrato bruto (EB) foi obtido a partir das folhas secas de *E. pyriformis*, pela técnica de maceração dinâmica com esgotamento do solvente (etanol 90° GL) e concentrado em evaporador rotativo. Seis gramas do EB foram fracionados em cromatografia em coluna, e eluído com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, as frações foram concentradas em um evaporador rotativo (Tecnal TE-210). O EB e as frações foram identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência à espectrometria de massas de alta resolução (CLAE-ESI/qTOF). A identificação química do extrato bruto e frações das folhas de *E. pyriformis* evidenciou a presença de compostos fenólicos destacando os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. De forma complementar, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre a provável ação antiviral dos compostos fenólicos e taninos presentes nas folhas de uvaia. Os resultados evidenciaram que os flavonoides quercetina e kaempferol possuem ação antiviral quando se ligam a glicoproteína do envelope ou capsídeo viral interferindo na ligação e penetração do vírus na célula. Este resultado coloca as folhas de *E. pyriformis* na lista de plantas com ação antiviral.

PALAVRAS-CHAVE: Uvaia; Quercetina; Kaempferol; Taninos hidrolisados; CLAE-ESI/qTOF.

DOI: [10.25110/arqsaude.v26i3.20228980](https://doi.org/10.25110/arqsaude.v26i3.20228980)

¹ Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: juliana.mendonca@edu.unipar.br

² Mestre em biotecnologia aplicada à Agricultura. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: isabelle.rahal.98@edu.unipar.br

³ Graduação em Química Industrial. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: gabriela.canonico@edu.unipar.br

⁴ Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Universidade estadual de Maringá (UEM).

E-mail: cristianigazim@prof.unipar.br

⁵ Doutora em Ciência Animal. Universidade Estadual de Londrina (UEL). E-mail: danieladib@prof.unipar.br

⁶ Mestre em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: adrianereunidos@hotmail.com

⁷ Médica Veterinária. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: bruna.laginestra@edu.unipar.br

⁸ Especialização Lato sensu em Saúde Pública. Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) - Anhanguera Educacional, Anhanguera. E-mail: larissarafaelapf@gmail.com

⁹ Doutorado em Biomedicina. Universidad de León – Espanha. E-mail: piau@prof.unipar.br

STUDY OF THE ANTIVIRAL POTENTIAL ON SARS COV-2 OF COMPOUNDS IDENTIFIED IN THE LEAVES OF THE GROSS EXTRACT OF *EUGENIA PYRIFORMIS*

ABSTRACT: *Eugenia pyriformis* Cambess (Myrtaceae), popularly known as uvaia. In its fruits, phenolic compounds with antioxidant action are found and in the leaves, high levels of flavonoids and hydrolyzed tannins were detected, which proved to be an inhibitor of the 2019 protease - nCoV and SARS-CoV. In this sense, the objective of this study was to obtain the crude extract of the leaves, the analysis of the chemical composition and the possibility of antiviral action against SARS COV-2. The crude extract (EB) was obtained from the dried leaves of *E. pyriformis*, by the dynamic maceration technique with solvent exhaustion (ethanol 90° GL) and concentrated in a rotary evaporator. Six grams of EB were fractionated in column chromatography, and eluted with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol, the fractions were concentrated on a rotary evaporator (Tecnal TE-210). EB and fractions were identified by high performance liquid chromatography using high resolution mass spectrometry (HPLC-ESI/qTOF). The chemical identification of the crude extract and fractions of *E. pyriformis* leaves evidenced the presence of phenolic compounds, highlighting phenolic acids, flavonoids and tannins. In addition, a bibliographic survey was carried out on the probable antiviral action of phenolic compounds and tannins present in uvaia leaves. The results showed that the flavonoids quercetin and kaempferol have antiviral action when they bind to the envelope glycoprotein or viral capsid, interfering with the binding and penetration of the virus into the cell. This result places *E. pyriformis* leaves in the list of plants with antiviral action.

KEYWORDS: Uvaia; Quercetin; Kaempferol; Hydrolyzed tannins; HPLC-ESI/qTOF.

ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIVIRAL SOBRE SARS COV-2 DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN LAS HOJAS DEL EXTRACTO CRUDO DE *EUGENIA PYRIFORMIS*

RESUMEN: *Eugenia pyriformis* Cambess (Myrtaceae), conocida popularmente como uvaia. En sus frutos se encuentran compuestos fenólicos con acción antioxidante y en las hojas se detectaron altos contenidos de flavonoides y taninos hidrolizados que demostraron inhibir la proteasa de 2019 - nCoV y SARS-CoV. En este sentido, el objetivo de este estudio fue obtener el extracto crudo de las hojas, el análisis de la composición química y la posibilidad de acción antiviral contra el SARS COV-2. El extracto crudo (EB) se obtuvo a partir de las hojas secas de *E. pyriformis*, mediante la técnica de maceración dinámica con agotamiento del disolvente (etanol 90° GL) y se concentró en evaporador rotatorio. Seis gramos de EB se fraccionaron en cromatografía en columna, y se eluyeron con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, las fracciones se concentraron en un evaporador rotatorio (Tecnal TE-210). El EB y las fracciones se identificaron mediante cromatografía líquida de alta resolución a espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-ESI/qTOF). La identificación química del extracto crudo y de las fracciones de las hojas de *E. pyriformis* mostró la presencia de compuestos fenólicos destacando los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos. De forma complementaria, se realizó un estudio bibliográfico sobre la probable acción antiviral de los compuestos fenólicos y los taninos presentes en las hojas de la uva. Los resultados mostraron que los flavonoides quercetina y kaempferol tienen acción antiviral cuando se unen a la glicoproteína de la envoltura o cápside viral, interfiriendo en la unión y penetración del virus en la célula. Este resultado sitúa a las hojas de *E. pyriformis* en la lista de plantas con acción antiviral.

PALABRAS CLAVE: Uva; Quercetina; Kaempferol; Taninos hidrolizados; CLAE-ESI/qTOF.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve avanços na química orgânica sintética principalmente depois do aparecimento da AIDS e da falta de métodos eficientes para evitar as doenças causadas por vírus. Assim, apesar dos avanços conseguidos com produtos sintéticos, as florestas tropicais brasileiras

ainda permanecem como parte integrante da terapêutica moderna como principal fonte para o desenvolvimento de substâncias bioativas (SIMONI, 2003). Existe um vasto potencial neste campo de pesquisa no Brasil visando o aproveitamento de plantas com valor curativo e que há muito tempo são utilizados pela medicina popular como medicamentos antibacterianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, anti tumorais e que agora podem ser utilizados como antivirais (PINTO *et al.*, 2002).

Substâncias bioativas com propriedades antivirais têm sido identificadas e seus mecanismos de ação elucidados. Alcaloides, proteínas, saponinas, flavonoides encontrados em extratos de plantas mostraram potencial antiviral. Os taninos hidrolisáveis, atraíram atenção significativa de Khalifa *et al.*, (2020), que investigaram 10 taninos hidrolisáveis estruturalmente diferentes como anti-COVID-19 natural através da ligação com a principal protease de 2019-nCoV usando modelagem de encaixe molecular via software Molecular Operating Environment (MOE, 2009).

Neste sentido, a busca por plantas ricas em taninos que possam ter ação antiviral tem sido o foco de muitas pesquisas. Dentre as espécies vegetais ricas em taninos destaca-se *E. pyriformis* Cambess nativa do bioma Mata Atlântica, pertencente à família Myrtaceae, comum nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio grande do Sul, conhecida pelo nome popular de uvaia, uvalha ou uvalha-do-campo (ARMSTRONG; DUARTE; MIGUEL, 2012). Suas folhas são utilizadas, em algumas regiões, para o tratamento de excesso de ácido úrico e também apresenta atividade antimicrobiana relacionada a alguns grupos de microrganismos (CHAVASCO; DIAS, 2014). Esta espécie é conhecida por pertencer ao grupo de frutas nativas benéficas para saúde (SALVADOR *et al.*, 2011), sendo comprovado pela riqueza de compostos fenólicos com ação antioxidantes dos seus frutos (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009). Além dos frutos, as folhas também contêm alto percentual de compostos fenólicos, destacando os ácidos fenólicos: gálico, p-cumárico, ferúlico; e os flavonoides: miricetina, quercetina e kaempferol, que foram identificados neste estudo.

No que diz respeito à potencial atividade antiviral dos compostos fenólicos, presume-se que eles poderiam atuar através da associação com proteínas das partículas virais e/ou das superfícies das células hospedeiras, resultando na redução ou prevenção da adsorção viral. A presença e localização das hidroxilas nas moléculas influenciam sua genotoxicidade, atividades antioxidante e antiviral (SAVI, 2004).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi a obtenção do extrato bruto das folhas de *E. pyriformis*, a análise da composição química, e a possibilidade da ação antiviral frente ao SARS COV-2.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do Material Vegetal

Foram coletadas folhas de *E. pyriformis* no horto Medicinal da UNIPAR – Umuarama - PR; região noroeste do estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas S23° 46.225' e WO 53° 16.730', altitude de 391m. A identificação botânica foi realizada pela Prof^ª. Dr^ª. Ezilda Jacomassi, e uma exsicata está catalogada sob o número 2502 no Horto Medicinal da Universidade Paranaense, foram registradas no Sistema Nacional de Gerenciamento do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de registro A80EA0F.

2.2 Obtenção do extrato bruto das folhas de *E. pyriformis*

As folhas (100 g) foram secas em esteira à temperatura ambiente, pulverizadas e o pó foi padronizado a uma granulometria de 850 µm. Este foi submetido ao processo de maceração dinâmica com renovação do solvente utilizando álcool etílico 80% (volume/volume) até o esgotamento do material vegetal (FERNANDEZ; ROSA; FERNANDEZ, 2017). O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório (modelo Tecnal TE-211) à 40 °C até obtenção do extrato bruto das folhas de uvaia.

2.3 Fracionamento do extrato bruto das folhas de *E. pyriformis*

Duas gramas (2,0 g) do extrato bruto das folhas foram submetidos ao fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando a sílica gel como fase estacionária e hexano, hexano–diclorometano (9:1; 8:2; 7:3 e 1:1), diclorometano–hexano (7:3; 8:2 e 9:1); diclorometano, diclorometano–acetato de etila (9:1; 8:2; 7:3 and 1:1); acetato de etila - diclorometano (7:3; 8:2 e 9:1); acetato de etila, acetato de etila -metanol (9:1; 8:2; 7:3 e 1:1); metanol: acetato de etila (7:3; 8:2 e 9:1) metanol.

2.4 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

O extrato bruto e frações foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (Shimadzu, Nexera X2) acoplada com espectrômetro de massa de alta resolução (QTOF Impact II, Bruker Daltonics Corporation, USA) equipada com uma fonte de ionização por eletropulverização. A tensão capilar foi operada no modo de ionização negativa, definida em 4500 V, e com um potencial de compensação da placa final de -500 V. Os parâmetros do gás seco foram ajustados para 8 L/min a 200 °C com uma pressão de gás de nebulização de 4 bar. A fragmentação, dissociação induzida por colisão (CID) foi realizada usando argônio (Ar) e energia de colisão de 15 a 30 eV. Os dados foram coletados de 50-1300 *m/z* com uma taxa de aquisição de 5 espectros por segundo, e os íons de interesse foram selecionados por fragmentação automática da varredura por

tandem mass spectrometry (MS/MS). A separação cromatográfica será realizada utilizando uma coluna C18 (75 × 2.0 mm i.d.; 1.6 µm Shim-pack XR-ODS III). A mistura gradiente de solventes A (H₂O) e B (acetonitrila) será a seguinte: 5% B 0-1 min, 30% B 1-4 min, 95% B 4-8 min, mantida a 95% de B 8-17 min, a 40 °C. A identificação desses compostos será proposta em uma revisão do gênero *E. pyriformis* (PHILLIPSON; STEYN, 2008; FERNÁNDEZ; ROSA; FERNANDEZ, 2017) além do valor do erro de massa e comparação com bancos de dados como MassBank (<http://www.massbank.jp/>) e Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>).

3. RESULTADOS

A identificação química por LC-MS do extrato bruto das folhas encontra-se discriminada na **Tabela 1**.

Tabela1: Identificação química por LC-MS do extrato bruto das folhas de *Eugenia pyriformis*.

	Fórmula molecular	Massa exata teórica <i>m/z</i> [M-H] ⁻	Massa exata experimental <i>m/z</i> [M-H] ⁻	Erro (ppm)	Tr	Amostra
Ácidos fenólicos						
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.0131	169.0114	10.06	0.69	EB
			169.0115	9.47	1.09	FR1
			169.0116	8.88	0.76	FR3
			169.0116	8.88	0.72	FRH
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	163.0389	163.0376	7.97	1.40	FR5
			163.0378	6.75	1.47	FR1
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0495	193.0478	8.81	1.54	FR1
Flavonoides						
Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	317.0291	317.0253	11.99	1.53	FR2
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.0342	301.0305	12.29	1.71	EB
			301.0311	10.29	1.58	FR1
			301.0309	10.96	1.68	FR2
			301.0317	8.30	1.73	FR3
			301.0318	7.97	1.72	FRH
Caempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.0393	285.0365	9.82	1.65	FR1
			285.0366	9.47	1.68	FR2
Taninos						
Hamamelitannin	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.0769	483.1786	210.52	1.48	FRH
			483.1800	213.40	1.47	FR3
1,2,6 Trigalloylglucose	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.0878	635.0803	11.81	0.68	FR3
Pauciflorol B	C ₄₂ H ₃₂ O ₉	679.1962	679.1581	56.09	1.48	FR2
Pauciflorol C	C ₅₆ H ₄₂ O ₁₂	905.2592	905.1071	168.02	1.77	FR2
Castalagin	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆	933.0628	933.2133	161.30	1.47	FR2

Prodelphiniline	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	609.1238	609.1162	12.48	1.57	FR1
Procyanidin	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	593.1289	593.1210	13.32	1.71	FR1
Elagic acid	C ₁₄ H ₆ O ₈	300.9978	300.9945	10.96	1.45	EB
Digalacturonic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₃	369.0664	369.0773	29.53	1.98	EB

4. DISCUSSÃO

Estudos químicos com espécies pertencentes ao gênero *Eugenia* revelaram a presença de flavonóides, taninos e ácidos fenólicos, e os estudos farmacológicos realizados com extratos brutos e compostos isolados das espécies comprovaram as atividades anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antiviral, antipirética, hipotensiva, antidiabética e antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2006; HASLAM, 2007).

Nas folhas de *E. pyriformis* foram identificados 15 compostos fenólicos pertencentes às classes dos ácidos fenólicos, flavonoides e taninos. Através do levantamento bibliográfico sobre a atividade antiviral dos compostos identificados (Tabela 1), os flavonoides quercetina e kampferol se destacaram por apresentarem atividade antiviral relatada na literatura.

Segundo Formica; Regelson (1995) nas plantas, a quercetina é produzida a partir dos fenilpropanóides e sua atividade antiviral relaciona-se com a sua capacidade de realizar a ligação com a glicoproteína do envelope ou capsídeo viral interferindo desta forma na ligação e penetração do vírus na célula, conseqüentemente interferindo na síntese de DNA, sendo também identificada a interferência dos flavonoides na inibição de proteases celulares dificultando a formação do desenvolvimento viral.

Vários vírus codificam canais seletivos de íons que se incorporam na membrana da célula infectada. A ativação de tais canais parece estar envolvida no processo de produção e liberação do vírus. Assim, substâncias que promovam a inibição da ativação do canal iônico neutralizam a produção de vírus; permitindo que o corpo infectado possa aumentar ou fortalecer seu próprio sistema imunológico. O canal iônico viral será, portanto, um candidato potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais. Neste contexto, o flavonol kaempferol e seus glicosídeos foram relatados como tendo alta atividade antiviral por atuarem bloqueando os canais iônicos virais (SCHWARZ *et al.*, 2014).

Neste sentido, a presença de compostos fenólicos nas folhas de *E. pyriformis*, abrem novas perspectivas para a continuidade das investigações do potencial antiviral, propondo os mecanismos de ação, bem como a possibilidade de desenvolvimento de fármacos com o extrato das folhas de uvaia.

5. CONCLUSÃO

Os flavonoides quercetina e kaempferol identificados no extrato bruto das folhas de *E. pyriiformis* mostraram possuir ação antiviral por se ligarem a glicoproteína do envelope ou capsídeo viral, causando interferência na ligação e penetração do vírus na célula. Este resultado coloca as folhas de *E. pyriiformis* na lista de plantas com ação antiviral.

REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, L.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the leaf and stem of *Eugenia pyriformis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 475-481, 2012.

CHAVASCO, J. K.; DIAS, A. L. T. Evaluation from suthern Minas Gerais Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v. 56, n.1, p. 13-20, 2014

FERNANDEZ, A. C. A. M. *et al.* Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Extract and Fractions of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd (Lamiaceae) Leaves from Brazil. **Current Microbiology**, v.74, n.12, p,1453-1460, 2017.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Revisão da biologia da quercetina e bioflavonóides relacionados. **Food and chemical toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

HASLAM, E. Taninos vegetais – Lições de uma vida fitoquímica. **Fitoquímica**, v. 68, n. 22-24, pág. 2713-2721, 2007.

KHALIFA, I. *et al.* Effects of Ten Structurally Different Hydrolysable Tannins through Binding with the Catalytic-Closed Sites of COVID-19 Main Protease: An In-Silico Approach. **Preprints**, 2020. 2020030277.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L.(Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 618-624, 2006.

PINTO, A. C. *et al.* Current Status, Challenges and Trends on Natural Products in Brazil. **Quim. Nova**, v. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.

PHILLIPSON, P. B.; STEYN, C. F. Tetradenia (Lamiaceae) in Africa: new species and new combinations. **Adansonia**, v. 30, n. 1, p.177-196, 2008.

SALVADOR, M. J. *et al.* Antioxidant capacity and phenolic content of four Myrtaceae plants of the south of Brazil. **Natural Product Communications**, v. 6, n.7, 2011.

SIMONI, I.C. Tratamentos Antivirais. **Biológico**. v.65, n.1/2, p.41-44, 2003.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, v. 34, n. 3, p. 7-16, 2009.

SAVI, L. A. (2004). **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidantes de compostos fenólicos**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 139p.

SCHWARZ, S. *et al.* Kaempferol derivatives as antiviral drugs against the 3a channel protein of coronavirus. **Planta medica**, v. 80, n. 02/03, p. 177-182, 2014.

Recebido em: 24/10/2022

Aceito em: 25/11/2022