

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

POLIANA GOMES DA SILVA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA  
JANDAIRA *Melipona subnitida* Ducke E DA PLANTA MILONA *Cissampelos sympodialis*  
Eichl. CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA

Recife  
2019

**POLIANA GOMES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GEOPRÓPOLIS DA  
ABELHA JANDAIRA *Melipona subnitida* Ducke E DA PLANTA MILONA *Cissampelos*  
*sympodialis* Eichl. CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em biociências e biotecnologia em saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de mestre em ciências.

Orientador: Dr. Lindomar José Pena

Coorientadores: Dr<sup>a</sup> Tania Maria Sarmiento da Silva

Dr. Eduardo de Jesus Oliveira.

RECIFE

2019

**Catologação na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

S586a Silva, Poliana Gomes da.  
Avaliação *in vitro* da atividade antiviral da geoprópolis da abelha jandaira *Melipona subnitida* ducke e da planta milona *Cissampelos sympodialis* eichl. contra os vírus dengue e zika / Poliana Gomes da Silva. - Recife: [s.n.], 2019.  
97 p. : ilus., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

Orientador: Lindomar José Pena; coorientadores: Tania Maria Samento da Silva, Eduardo de Jesus Oliveira.

1. Dengue. 2. Zika. 3. Antivirais. I. Pena, Lindomar José. II. Silva, Tania Maria Samento da. III. Oliveira, Eduardo de Jesus. IV. Título.

CDU 616.92

---

**POLIANA GOMES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAIRA *Melipona subnitida* Ducke E DA PLANTA MILONA *Cissampelos sympodialis* Eichl. CONTRA OS VÍRUS DENGUE E ZIKA**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de mestre em ciências.

Aprovada em: 29/07/2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Lindomar José Pena (Orientador)**

Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

---

**Dr<sup>a</sup>. Sheilla Andrade de Oliveira**

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

**Dr. Ronaldo Nascimento de Oliveira**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Aos meus pais Isaias e Luzinete que sempre garantiram o cuidado e educação dos filhos. A minha avó Luzinete e ao meu irmão Lucas pelo apoio e afeto. Ao meu marido, Pedro pelo companheirismo e aos meus amigos do grupo de pesquisa e do LaViTE pelo conhecimento sempre compartilhado.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar força para continuar e por conceder a realização deste sonho;

A minha mãe Luzinete Inacio pelo imenso amor, confiança e incentivo;

A minha família pelo amor, confiança, suporte e dedicação;

Ao meu marido Pedro Felipe pelo amor, companheirismo e paciência;

As minhas amigas de toda vida, Soraya Jordão e Aline Suellen;

Aos meus amigos da graduação pelo incentivo e apoio durante a jornada em especial; Ana Laurentino, Luiz Palhares Neto, Natalia Ferreira e Raphael Neves;

Aos meus amigos do LaViTE, pelo suporte, incentivo, amor, alegria e conhecimentos sempre compartilhados; em especial Ada Lúcia, Bárbara Nayane, Caroline Simões, Daniele Félix, Fábria Cruz, Jurandy Ferraz, Klarissa Guarines, Pablo Cantalice, Paulo André, Rafael Rosa, Renata Pessôa, Severino Jefferson, Vanessa Alessandra e Willyenne Dantas. Com vocês a caminhada tem sido muito mais fácil e divertida;

Aos meus amigos da *English For Life* pela paciência, compreensão e amor sempre presentes; em especial Camila Paiva, Edson Fernando (Mr. Ed), Emellyne Santos, Evaldo Figueredo, Gleicy Andréa, Louise Braga, Luener Correa e Marianna Morera;

A todos os colegas que compartilharam disciplinas, provas e trabalhos durante o curso de mestrado;

Ao meu orientador Dr Lindomar José Pena, pela oportunidade de orientação, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo incentivo;

A Dra Tania Maria Sarmiento (Departamento de Química - UFRPE) e ao Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (UFVJM – Departamento de Química) pela co-orientação e confiança;

Ao Dr Gustavo Seabra (UFPE – Departamento de Química) pela cooperação com os estudos de *docking* molecular;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz pela oportunidade;

A todos os meus professores, desde o ensino fundamental até a pós-graduação, pela dedicação, incentivo e conhecimentos transmitidos;

A FACEPE, pela bolsa concedida;

Desde já, agradeço à banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho;

A todos que de algum modo me ajudaram na realização deste trabalho.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

**Marie Curie**

SILVA, Poliana Gomes. **Avaliação *in vitro* da atividade antiviral da geoprópolis da abelha jandaira *Melipona subnitida* Ducke e da planta milona *Cissampelos sympodialis* Eichl. contra os vírus dengue e Zika.** 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

## RESUMO

A abelha jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) típica do sertão e endêmica das Caatingas Nordestinas utiliza diversos materiais para a construção e proteção dos seus ninhos contra inimigos, como resinas, cera e barro. A mistura desse material é chamada de geoprópolis. Um estudo químico realizado pelo grupo da Dra. Tania Sarmento (UFRPE), colaboradora do projeto, realizou o isolamento e identificação de extratos e substâncias derivados da geoprópolis. Adicionalmente, um estudo realizado pelo grupo do Dr. Eduardo Oliveira (UFVJM), colaborador do projeto, realizou o isolamento e identificação de extratos alcaloides derivados da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) uma planta endêmica do Brasil, presente nas regiões nordeste e sudeste. A possível atividade antiviral da espécie de planta e da geoprópolis como fontes de substâncias contra vírus de interesse para a saúde pública, sobretudo os vírus de RNA, ainda não foi avaliada. Dentre esses destacamos o vírus dengue (DENV) sorotipo 2 e Zika (ZIKV). No caso do DENV, atualmente, a doença é de grande preocupação para a saúde pública global e apesar do importante impacto clínico, econômico e social, não existe tratamento específico descrito para a dengue. No caso do ZIKV, o patógeno é considerado fator necessário para o desenvolvimento de distúrbios neurológicos severos, entre eles a síndrome de Guillain-Barré, e é o agente causal da Síndrome Congênita do Zika (SCZ). Atualmente, não existe tratamento específico ou uma vacina contra o ZIKV. O estudo avalia a atividade antiviral de compostos isolados da geoprópolis e da milona contra o DENV e ZIKV. Inicialmente foram determinadas as concentrações máximas não tóxicas, para as células Vero, dos compostos extraídos da geoprópolis: o extrato etanólico, a fração acetato de etila, a fração hexânica e as substâncias isoladas Naringenina e 7-metoxi-naringenina; e dos compostos isolados da milona: o extrato bruto, a fração de alcaloides terciários totais e seus diferentes picos. Dentre os compostos testados apenas a fração hexânica apresentou alta toxicidade, a qual foi, portanto, descartada dos testes seguintes. Como conclusão foi possível determinar quais dentre os compostos testados não possuem capacidade de combate para o DENV e para o ZIKV e quais apresentam significativa resposta antiviral frente a cada um dos vírus em estudo.

**Palavras-chave:** Dengue. Zika. Antivirais.



SILVA, Poliana Gomes. *In vitro* antiviral evaluation of geopropolis from jandaira bee *Melipona subnitida* Ducke and from milona plant *Cissampelos sympodialis* Eichl. against dengue and Zika virus. 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

## ABSTRACT

The jandaira bee (*Melipona subnitida* Ducke) typical and endemic of the Northeastern Caatingas uses diverse materials for the construction and protection of its nests against enemies, like resins, wax and mud. The mixture of this material is called: geopropolis. A chemical study done by the group of Dr. Tania Sarmiento, collaborator of the project, carried out the isolation and identification of extracts and substances derived from geopropolis. In addition, a study realized by the group of Dr. Eduardo Oliveira, collaborator of the project, carried out the isolation and identification of alkaloid extracts derived from Milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.), a plant endemic to Brazil, present in the northeast and southeast regions. The possible antiviral activity of this plant and the geopropolis, as sources of substances against viruses of public health interest, especially RNA viruses, has not yet been evaluated. Among these, we highlight the dengue (DENV), serotype 2 and Zika (ZIKV) viruses. In the case of DENV, currently, the disease is a great concern to global public health and despite the clinical importance, economic and social impact, there is no specific treatment described for dengue. In the case of ZIKV, the pathogen is considered a necessary factor for the development of severe neurological disorders, including Guillain-Barré syndrome, the virus is also the causative agent of the Zika congenital syndrome (CZS). Currently there is no specific treatment or vaccine against ZIKV. This study evaluates the antiviral activity of compounds isolated from the geopropolis and milona against DENV 2 and ZIKV. First, the maximum non-toxic concentrations for Vero cells of compounds extracted from the geopropolis were determined: ethanolic extract, ethyl acetate fraction, hexane fraction and isolated substances naringenin and 7-methoxy-naringenin; and the isolated milona compounds: the crude extract, the fraction of total tertiary alkaloids and their different peaks. Among the compounds tested only the hexane fraction showed high toxicity, which was discarded from the following tests. As a conclusion, it was possible to determine which of these compounds do not have combat capacity for and DENV 2 and ZIKV; and which have significant antiviral response against each of the virus under study.

**Keywords:** Dengue. Zika. Antivirals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da partícula viral imatura e madura.....	23
Figura 2 - Estrutura genômica dos Flavivírus.....	23
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de replicação dos <i>Flavivirus</i> .....	25
Figura 4 - Distribuição mundial do vírus dengue.....	27
Figura 5 - Distribuição mundial do vírus Zika.....	29
Quadro 1 - Drogas antivirais atualmente disponíveis para o combate dos principais Flavivirus .....	33
Figura 6 - Geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão jandaira ( <i>Melipona subnitida</i> Ducke).....	38
Figura 7 - Abelha sem ferrão jandaira ( <i>Melipona subnitida</i> Ducke).....	39
Figura 8 - Raiz da planta milona ( <i>Cissampelos sympodialis</i> Eichl.).....	40
Figura 9 - Esquema para isolamento das substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina a partir da fração AcOEt da geoprópolis da abelha jandaira.....	47
Figura 10 - Flavonóides isolados da geoprópolis da abelha jandaira.....	48
Figura 11 - Esquema para isolamento dos picos 1-6 e da substância warifteína (pico 5) a partir da Fração de Alcalóides terciários Totais (FAT) da planta milona.....	50
Figura 12 - Alcaloide isolado da planta milona.....	51
Figura 13 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o Extrato Etanólico (EtOH) e frações Acetato de Etila (AcOEt) e hexânica da geoprópolis.....	58
Figura 14 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o flavonóide narigenina isolado da geoprópolis .....	58
Figura 15 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o flavonóide 7-metoxi- narigenina isolado da geoprópolis.....	59
Figura 16 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o Extrato Bruto e a Fração de Alcalóides terciários Totais (FAT).....	60
Figura 17 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com os picos 1, 2 e 3 isolados da milona.....	60
Figura 18 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com os picos 4, 5 e 6 isolados da milona.....	61
Figura 19 - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o alcaloide warifteína isolado da milona.....	61

Figura 20 - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o flavonóide narigenina.....	64
Figura 21 - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o flavonóide 7-metoxi –narigenina.....	65
Figura 22 - Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após tratamento com o flavonóide narigenina.....	66
Figura 23 - Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após tratamento com o flavonóide 7-metoxi - narigenina.....	67
Figura 24 - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o pico 6, isolado da milona.....	68
Figura 25 - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona.....	69
Figura 26 - Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona.....	70
Figura 27 - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com Extrato Etanólico (EtOH) e fração Acetato de Etila (AcOEt).....	71
Figura 28 - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com as substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina isoladas da geoprópolis.....	72
Figura 29 - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com Extrato Etanólico (EtOH) e fração Acetato de Etila (AcOEt).....	74
Figura 30 - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com as substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina isoladas da geoprópolis.....	74
Figura 31 - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com os compostos isolados da milona: Extrato Bruto, Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT).....	76
Figura 32 - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com os picos 1-6 isolados da milona.....	77
Figura 33 - Análise do título viral do DENV-2 após o tratamento com diferentes concentrações do pico 6 isolado da milona.....	78
Figura 34 - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona.....	78

Figura 35 - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com os compostos isolados da milona: Extrato bruto, Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT).....	80
Figura 36 - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com os picos 1-6 isolados da milona.....	80
Figura 37 - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona.....	81
Figura38 - <i>Docking</i> molecular 7-metoxi-narigenina e narigenina .....	83
Figura 39 - <i>Docking</i> molecular warifteína.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa do $CC_{50}$ e $CC_{20}$ do extrato, frações e substância isolados da geoprópolis e das frações alcaloides isolados a partir da milona em células Vero.....	62
Tabela 2 - Estimativa do $CC_{50}$ e $CC_{20}$ de substâncias isoladas da geoprópolis e da milona em células Vero.....	63
Tabela 3 - Estimativa do $IC_{50}$ e IS de substâncias isoladas da geoprópolis em células Vero contra o DENV-2.....	73
Tabela 4 - Estimativa do $IC_{50}$ e IS de substancias isoladas da geoprópolis em celulas Vero contra o ZIKV.....	75
Tabela 5 - Estimativa do $IC_{50}$ e IS de substâncias isoladas da milona em células Vero contra o DENV-2.....	79
Tabela 6 - Estimativa do $IC_{50}$ e IS de substâncias isoladas da milona em células Vero contra o ZIKV.....	82

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>BBI</b>	Bisbenzilisquinolínicos
<b>C</b>	Proteína do Capsídeo
<b>CC<sub>20</sub></b>	Concentração Citotóxica 80% de viabilidade
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentração Citotóxica 50% de viabilidade
<b>CCDA</b>	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<b>CMNT</b>	Concentração Máxima Não Tóxica
<b>DENV</b>	Vírus da dengue
<b>DepFar</b>	Departamento de Farmácia
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidade Óptica
<b>E</b>	Glicoproteína do Envelope
<b>EC50</b>	Concentração Efetiva
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>ECP</b>	Efeito Citopático
<b>EtOH</b>	Extrato Etanólico bruto
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HSV</b>	<i>Herpes Simplex Virus</i>
<b>HSV-1</b>	<i>Herpes Simplex Virustype 1</i>
<b>IAM</b>	Instituto Aggeu Magalhães
<b>IQ</b>	Isoquinolínico
<b>IS</b>	Índice de Seletividade
<b>JEV</b>	Vírus da encefalite japonesa
<b>kb</b>	Kilobases
<b>LAVITE</b>	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
<b>M</b>	Proteína de membrana
<b>μM</b>	Micromolar

<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MOI</b>	Multiplicidade de Infecção
<b>NP</b>	Ácido difenilbóricoetanamina
<b>NS</b>	Proteínas não-estruturais
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS/OMS</b>	Organização Pan-americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>prM</b>	Pré Membrana
<b>RdRp</b>	NA Polimerase dependente de RNA
<b>RER</b>	Retículo Endoplasmático Rugoso
<b>RMNde<sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>RMNde<sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensageiro
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SCZ</b>	Síndrome Congênita do Zika
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>TBEV</b>	Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
<b>TCID</b>	<i>Tissue Culture Infective Dose</i>
<b>UFPE</b>	Universidade Federal de Pernambuco
<b>UFRPE</b>	Universidade Federal Rural de Pernambuco
<b>UFVJM</b>	Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
<b>WNV</b>	Vírus do oeste do Nilo
<b>YFV</b>	Vírus da febre amarela
<b>ZIKV</b>	Vírus Zika
<b>µg</b>	Micrograma
<b>6MMP<sub>r</sub></b>	6-methylmercaptopurine riboside

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL</b> .....	21
2.1 PRINCIPAIS FLAVIVIVUSDE IMPORTÂNCIA MÉDICA NO BRASIL .....	21
2.1.1 Propriedades dos Flavivivus .....	22
2.1.2 Ciclo replicativo dos Flavivivus .....	23
2.1.3 Vírus dengue e doenças associadas .....	26
2.1.4 Vírus Zika e doenças associadas .....	28
2.1.5 Terapia antiviral contra os vírus dengue e Zika .....	30
2.2 GEOPRÓPOLIS .....	38
2.3 MILONA .....	40
<b>3 JUSFICATIVA</b> .....	42
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	44
<b>5 OBJETIVO GERAL</b> .....	45
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
<b>6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	46
6.1 EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS .....	46
6.2 CÉLULAS E VÍRUS.....	51
6.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	52
6.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	54
6.4.1 Screening antiviral.....	54
6.4 2 Ensaio de titulação viral .....	55
6.5 DOCKING MOLECULAR.....	55
6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>7 RESULTADOS</b> .....	57
7.1 CITOTOXICIDADE .....	57
7.2 SCREENING.....	63
7.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL .....	70
7.3.1 Derivados da geoprólis frente aos vírus dengue e Zika.....	71
7.3.2 Derivados da planta milona frente aos vírus dengue e Zika.....	75
7.4 DOCKING MOLECULAR.....	82
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	85



<b>9 CONCLUSÕES.....</b>	<b>88</b>
<b>10 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças virais são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade em populações humanas de todo o mundo (WILDER-SMITH *et al.*, 2017). Combater os mosquitos transmissores é uma alternativa pouco eficiente diante do modelo de vida atual e dos aspectos estruturais das grandes cidades, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil. Diversas viroses tais como HIV, hepatites virais, dengue, influenza, dentre outros representam sérios agravos à saúde humana, tornando a descoberta e desenvolvimento de fármacos antivirais de suma importância (LOW *et al.*, 2017). Além da problemática relacionada à falta de métodos de diagnóstico eficientes e a escassez de métodos de tratamento (SILVA, S. *et al.*, 2019); as drogas antivirais quando comparadas ao número de fármacos antibacterianos e antifúngicos, disponíveis para uso clínico também são poucas e muitas delas apresentam eficácia limitada. Estas circunstâncias salientam a importância do desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Uma vez que os vírus usam a maquinaria celular para replicação, encontrar substâncias que interfiram especificamente com atividades virais sem causar danos significativos para as atividades celulares é um grande desafio. Além disso, a extrema velocidade com que os vírus evolue, esta associada ao rápido desenvolvimento de resistência por parte dos vírus aos fármacos existentes exige o desenvolvimento contínuo de novos medicamentos antivirais (SUKHRALIA *et al.*, 2019). Dentre os vírus para os quais o desenvolvimento de antivirais é uma necessidade premente, destacamos os vírus dengue (DENV) e Zika (ZIKV). Estas arboviroses de natureza epidêmica são de extrema importância para a pesquisa e para a saúde pública no Brasil. Os últimos 50 anos, após o surgimento destas viroses, nos permitiram perceber o quanto às consequências clínicas são incapacitantes para o paciente, ou em algumas situações causam mortalidade (WILDER-SMITH *et al.*, 2017).

Uma das alternativas para o combate aos vírus causadores destas enfermidades vem da geoprópolis da abelha jandaira. As abelhas da subfamília *Meliponinae* (Hymenoptera: Apidae) conhecidas como “abelhas sem ferrão” são insetos polinizadores e estão distribuídas nas regiões tropicais do planeta, especialmente na América do Sul, por se adaptarem às condições ecológicas locais (PEREIRA *et al.*, 2017). Dentre os diversos membros desta subfamília, a abelha jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) é típica do sertão e endêmica das regiões de caatinga no nordeste do Brasil (CÂMARA *et al.*, 2004). Estas abelhas utilizam

diversos materiais para a construção e proteção dos seus ninhos contra inimigos, tais como resinas, cera e barro. A mistura desse material de consistência dura e coloração característica do barro da região é chamada de geoprópolis (SOUZA, F. *et al.*, 2013). Recentemente, foram descritas atividades antibacteriana (SOUZA, S. *et al.*, 2016) e antiproliferativa da geoprópolis de uma das espécies de abelhas desta mesma subfamília a *Melipona scutellaris*. Em relação à atividade antiviral já descrita, podemos destacar a ação contra o herpes simples tipo 1 (HSV-1), da geoprópolis proveniente da abelha *Scaptotrigona postica* (COELHO *et al.*, 2015). Porém, a atividade antiviral contra outros vírus de interesse para a saúde pública, sobretudo os vírus de RNA, ainda não foi avaliada.

Adicionalmente, outro recurso para descoberta de novos e eficientes antivirais é a fitoterapia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define “fitoterapia” como um material derivado de plantas ou uma preparação com benefícios terapêuticos ou outros benefícios para a saúde humana que contém ingredientes brutos ou processados de uma ou mais plantas (CAVALCANTI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2012). As plantas medicinais representam uma das fontes mais ricas de compostos com atividade farmacológica (JASSIM; NAJI, 2003; MUKHTAR *et al.*, 2008).

A ação antiviral das ervas medicinais tem sido avaliada em grande escala e inclui vários compostos com capacidade terapêutica comprovada como, por exemplo, os extratos metanólicos de *Andrographis paniculata*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum* e *Pelargonium citrosum* para o vírus dengue sorotipo 1 (DENV-1); o alcaloide beberina e a emodina, um derivado da antraquinona para o vírus Zika. (ABD KADIR *et al.*, 2013; BATISTA *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2012).

A planta milona, recebe destaque neste estudo por apresentar uma fonte natural para a obtenção de potenciais antivirais. *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) popularmente conhecida como jarrinha ou milona, é uma planta endêmica do Brasil, presente nas regiões nordeste e sudeste, desde o estado do Ceará até o estado de Minas Gerais, comum em áreas abertas e solo argiloso, distinguida principalmente pelo formato de suas folhas deltóides (PORTO *et al.*, 2008). A planta é utilizada na medicina popular no Brasil para o tratamento da asma, bronquite e influenza entre outras doenças (CERQUEIRA-LIMA *et al.*, 2010). Embora diversos efeitos farmacológicos e imunomoduladores da *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) terem sido descritos (CAVALCANTI *et al.*, 2014), o

potencial da espécie como fonte de drogas antivirais é pouco explorado. Dentre os estudos disponíveis podemos destacar uma triagem com 30 extratos metanólicos e aquosos de espécies da medicina tradicional chinesa também pertencentes à família Menispermaceae. Este estudo resultou na identificação de 13 alcaloides bisbenzilisoquinolínicos provenientes da espécie *Stephania cepharantha* que possuem atividade sobre o vírus *Herpes simplex* (HSV) (NAWAWI *et al.*, 1999). Outra espécie do gênero *Cissampelos*, a *Stephania tetrandra*, forneceu o alcaloide frangchinolina, com atividade sobre o vírus HIV-1 que de acordo com os autores parece interferir no processamento da proteína do envelope viral (KANG *et al.*, 1996).

Assim sendo, o presente trabalho avaliou a atividade antiviral do extrato, frações e substâncias isoladas tanto da geoprópolis da abelha jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) quanto do extrato, fração, picos e substâncias isoladas da planta milona *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) contra os vírus ZIKV e DENV, a fim de identificar novas opções terapêuticas para estas viroses tão significantes para a saúde pública.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

O presente tópico apresenta os aspectos teóricos dos temas abordados no decorrer do trabalho: *Flavivirus* de importância médica no Brasil, as propriedades e ciclo replicativo dos *Flavivirus*, os vírus dengue e Zika e as doenças associadas, as terapias antivirais disponíveis, geópolis e milona.

### 2.1 PRINCIPAIS FLAVIVIRUS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA NO BRASIL

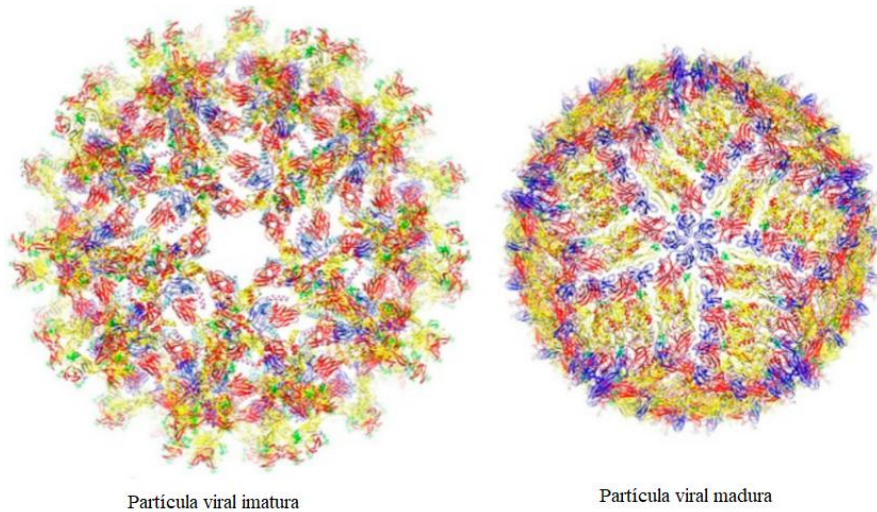
O gênero *Flavivirus*, pertence à família Flaviviridae. Esta família a qual também abrange outros dois generos nomeados *Pestivirus* e *Hepacivirus*, que inclui o vírus da Hepatite C (HASAN *et al.*, 2018; LINDENBACH *et al.*, 2007) O gênero *Flavivirus* inclui mais de 70 membros dentre estes, muitos são patógenos virais importantes para a saúde mundial, pois causam uma grande variedade de doenças incluindo febres, encefalites e febres hemorrágicas (LINDENBACH *et al.*, 2007). Exemplos importantes pertencentes a esse gênero incluem: o vírus da febre amarela (YFV), o vírus do oeste do Nilo (WNV), o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), o vírus da dengue (DENV) e o vírus Zika (ZIKV) (HASAN *et al.*, 2018). O gênero consiste principalmente de patógenos humanos transmitidos por artrópodes. Devido a uma relação complexa e dinâmica, que envolve insetos vetores, humanos e o meio ambiente estas doenças são definidas com arboviroses (CHAMBERS *et al.*, 1990). As consequências clínicas são variadas, podem causar, no individuo afetado, uma morbidade incapacitante, asseverar uma doença crônica já existente ou até avançar para mortalidade (BOTTING; KUHN, 2012). As implicações geradas em decorrência destas patologias afetam milhões de pessoas a cada ano, em todo o mundo (BOTTING; KUHN, 2012).

### 2.1.1 Propriedades dos Flavivirus

Os vírus pertencentes à família *Flavivirus* são pequenos vírus envelopados (~50 nm) (Figura 1). Apresentam o genoma completo com aproximadamente 9.500-12.500 nucleotídeos, os quais formam uma fita simples de RNA, sentido positivo (5' – 3') que contém um único quadro de leitura aberta ORF (do inglês open reading frame) flanqueado por regiões não traduzidas 5' e 3'. (CHAMBERS *et al.*, 1990) (Figura 2). A extremidade 5' do genoma possui uma molécula de 7-metilguanossina conferindo o capeamento desta região, porém na extremidade 3' a cauda poli-A não está presente (Figura 2) (SAMPATH; PADMANABHAN, 2000).

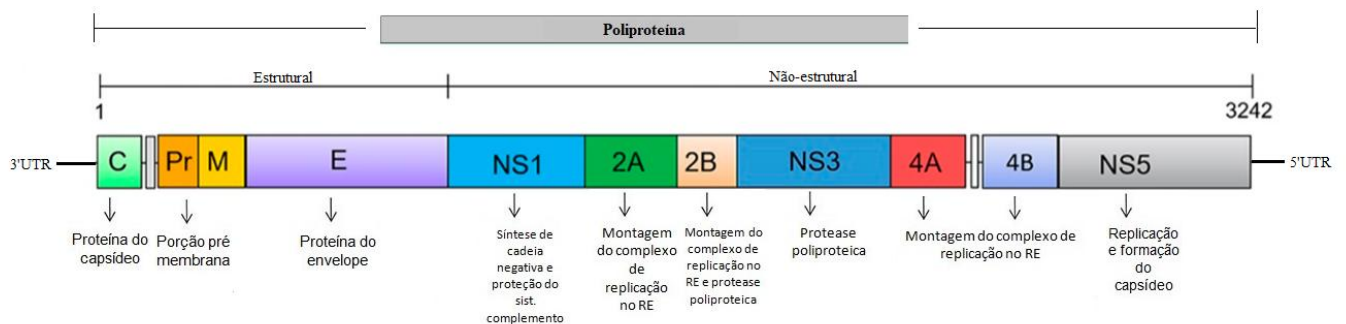
A ORF codifica para uma poliproteína que constitui a arquitetura estrutural do vírus (CHANG *et al.*, 2016). A estrutura da partícula viral além de envelope apresenta uma proteína que forma o capsídeo. Esta estrutura abriga o genoma do vírus, o qual tem tamanho aproximado de 11 kilobases (kb). Adicionalmente o genoma possui estruturas secundárias necessárias ao processo de tradução e replicação viral (LINDENBACH *et al.*, 2007). Durante o processo de proliferação do vírus, dentro da célula hospedeira, o genoma é processado em três proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C, 105 aa), proteína de membrana (M) a qual contém uma porção pré membrana (prM) (187 aa) e a glicoproteína do envelope (E, 505 aa) e sete proteínas não-estruturais (NS). NS1 (352 aa), NS2a (217 aa), NS2b (139 aa), NS3 (619 aa), NS4a (127 aa), NS4b (255 aa) e NS5 (904 aa) (RICE *et al.*, 1985) (Figura. 2). A partícula viral madura possui envelope com forma icosaédrica e diâmetro de 500 Å (Figura 1). A proteína do envelope (E) inicialmente forma um complexo com a proteína pré-membrana (prM), formando partícula virais imaturas posteriormente durante o ciclo de replicação viral, ocorrem alterações neste complexo permitindo que as partículas amadureçam, ou seja, a montagem do vírion completo lhes confere a capacidade infectiva (Figura 1).

**Figura 1** - Estrutura da partícula viral imatura e madura.



Fonte: Hu e Sun (2019, tradução nossa)

**Figura 2** - Estrutura genômica dos *Flavivirus*.



Fonte: Adaptado de Bera *et al.* (2007, tradução nossa); Hu e Sun (2019, tradução nossa)

### 2.1.2 Ciclo replicativo dos *Flavivirus*

O ciclo de vida completo dos *Flavivirus* envolve o papel do mosquito como transmissor-vetor e o homem como principal vítima e fonte de infecção. O mosquito adquire o vírus, principalmente, enquanto se alimenta do sangue de uma pessoa infectada. O vírus é transmitido a outros seres humanos através das picadas de mosquitos fêmeas infectadas. Após a incubação do vírus por 4 a 10 dias, o mosquito infectado é capaz de transmitir o vírus pelo resto da vida; em média, em torno de 30 dias (ESPIRITO SANTO, 2019).

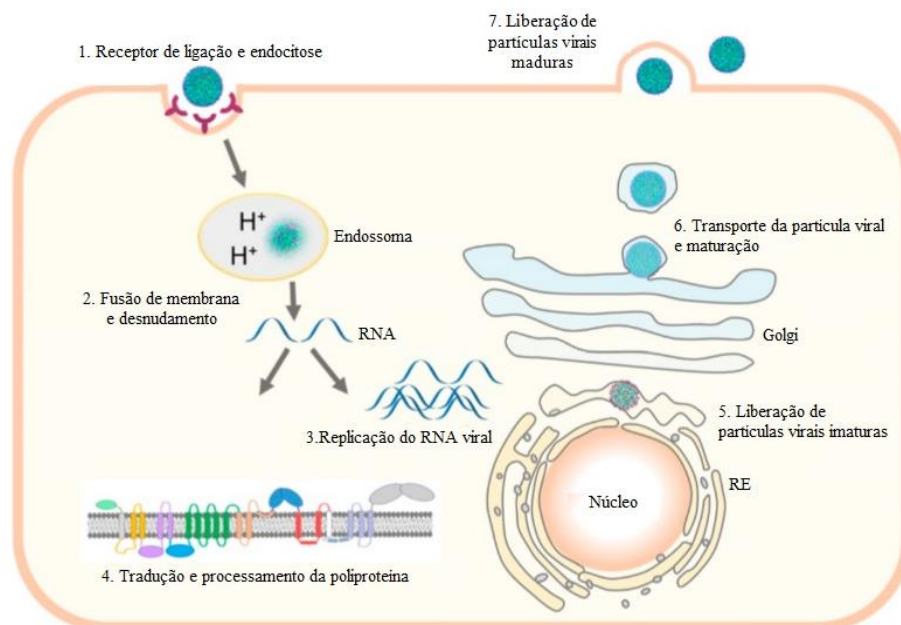
A infecção viral ocorre partir da adsorção e penetração do vírus na célula hospedeira. Monócitos, macrófagos e células dendríticas estão dentre os tipos celulares mais comumente suscetíveis à infecção por Flavivirus *in vivo* (BARBA-SPAETH et al., 2016; KRISHNAN et al., 2007; LOZACH et al., 2005; MARIANNEAU, et al., 1999; TASSANEETRITHEP et al., 2003). Os Flavivirus preferencialmente infectam células e tecidos específicos. O tropismo tecidual dos Flavivirus determina as características clínicas dos casos graves e os padrões de transmissão viral entre humanos (BOLDESCU et al., 2017). O vírus Zika, mais especificamente, possui tropismo por células dos tecidos neural, ocular, testicular e placentário (SHAILY; UPADHYA, 2019); e pode causar causa numerosas complicações neurológicas, desde mielite e encefalite até convulsões, dano cerebral permanente e paralisia (BOLDESCU et al., 2017; SELVEY et al., 2016;). Existem também as infecções virais não-neurotropicas como o vírus da dengue, que possui a capacidade de replicação em um amplo espectro de tipos celulares, devido à variabilidade de interação com os receptores de superfície celular (ACOSTA et al., 2009). Os Flavivirus têm entrada por endocitose mediada por clatrina, proteína que permite a formação de vesículas membranares no interior de células eucariontes.

Este processo tem início quando a proteína do envelope interage com um receptor ainda desconhecido induzindo uma mudança no pH do endossoma formado. O baixo pH da vesícula endossomal permite o rearranjo da proteína E, que induz a fusão da membrana do endossoma com o envelope do vírus, como consequência ocorre então a liberação do genoma viral no citoplasma (Figura 3.1) (BOTTING; KUHN, 2012; HU; SUN, 2019). O RNA viral é então traduzido em uma longa poliproteína (Figura 3.4). Durante o processo de tradução ocorre a ação de serino-proteases (NS2B/NS3) codificadas pelo vírus e de proteases codificadas pela célula hospedeira (SAMPATH; PADMANABHAN, 2010). Como resultado dessa etapa as proteínas recém-sintetizadas: pré-membrana (prM) e do envelope (E) são englobadas pelo retículo endoplasmático para a formação do nucleocapsídeo e permanecem ligadas ao lúmen do retículo, até que sejam recrutadas para a formação da partícula viral imatura (Figura 3.5) (BOTTING; KUHN, 2012; HU; SUN, 2019). Para a formação do RNA viral, inicialmente forma-se o complexo de replicação e posteriormente tem início a transcrição. O RNA recém-sintetizado se associa com a proteína C (capsídeo), atraindo a proteína prM (pré membrana) e a proteína E (envelope); as quais sofrem uma heterodimerização e posteriormente brotam do lúmen do RER para formar a partícula viral



ainda imatura (Figura 3.5) (SAMPATH; PADMANABHAN, 2010). A partícula é transportada pela membrana plasmática do RER por uma via secretória. O baixo pH da região trans do complexo de Golgi causa um rearranjo substancial da proteína a prM, permitindo a clivagem pela enzima furina de prM em M e resultando na homodimerização da proteína E (Figura 3.6) (RUMLOVÁ; RUMML, 2018). A associação permanece devido ao baixo pH da região, até que na presença do pH neutro da região extracelular, pr é liberado (Figura 3.6) (RUMLOVÁ; RUMML, 2018). O vírion maduro sai da célula por exocitose em direção a circulação sanguínea, com capacidade de infectar uma nova célula hospedeira (Figura 3.7) (STIASNY; HEINZ, 2006).

**Figura 3** - Representação esquemática do ciclo de replicação dos *Flavivirus*.



Fonte: Adaptado de Hu e Sun (2019, tradução nossa)

Legenda: Replicação viral: **1.** Adsorção viral; **2.** Penetração do vírus na célula hospedeira; **3.** RNA viral é replicado; **4.** Poliproteína processada em porção estrutural e não-estrutural - proteínas estruturais e não-estruturais recém-sintetizadas seguem para o retículo endoplasmático (RE); **5.** O RNA recém-sintetizado se associa com as proteínas estruturais e não-estruturais e posteriormente brota do lúmen do RE para formar a partícula viral ainda imatura; **6.** O baixo pH do complexo de Golgi permite um rearranjo substancial da proteína a prM - clivagem pela enzima furina de prM em M o que resulta na homodimerização da proteína E; **7.** A partícula madura é liberada.

Os seres humanos sintomáticos ou assintomáticos (1 em cada 5 pessoas infectadas) infectados são os principais portadores e multiplicadores do vírus, servindo como fonte do

vírus para os mosquitos não infectados (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2019). Os pacientes que já estão infectados com o DENV podem transmitir a infecção (por 4 a 5 dias; no máximo 12) através de mosquitos do gênero *Aedes* após o aparecimento dos primeiros sintomas. No caso do ZIKV a infecção dura por volta de 5 dias. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2019).

### 2.1.3 Vírus dengue e doenças associadas

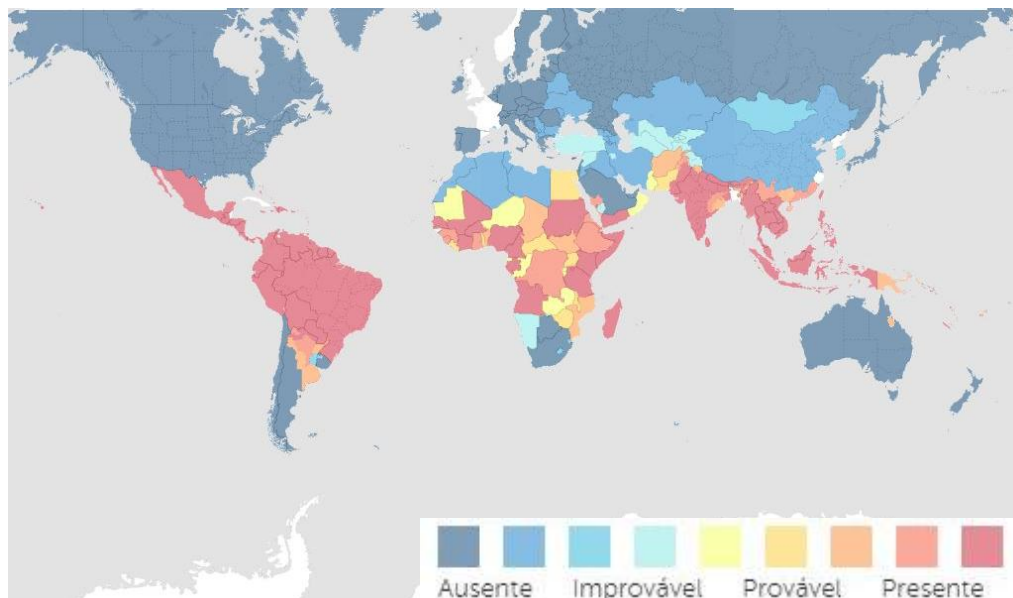
O DENV foi isolado pela primeira vez em 1944 no Haváí (SUKHRALIA *et al.*, 2019) e então ressurgiu no final do século 20 e início do século 21 devido ao aumento da distribuição geográfica dos mosquitos vetores, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e à falta de métodos efetivos de controle de vetores, vacinas ou tratamentos antivirais (BARROWS *et al.*, 2018). Atualmente, o DENV circula em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (Figura 4).

O DENV é transmitido por mosquitos da espécie *Aedes aegypti* definido como o principal vetor da DENV, os mosquitos da espécie *Aedes albopictus*, são vetores secundários. Existem quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e todos resultam em manifestações clínicas semelhantes. Os sorotipos apresentam cocirculação em países tropicais e subtropicais do globo (ACOSTA *et al.*, 2008). Entre os sorotipos, os genótipos “asiáticos” de DENV-2 e DENV-3 estão frequentemente associados a doenças graves que acompanham infecções secundárias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2018). A infecção por DENV-2 tem maior probabilidade de resultar em doença grave em comparação com outros sorotipos (BALMASEDA *et al.*, 2006; FARES *et al.*, 2015; SUKHRALIA *et al.*, 2019). Este sorotipo esteve presente nos principais surtos de dengue desde 1990 quando foi documentado pela primeira vez (FARES, *et al.*, 2015; GUZMAN, *et al.*, 2010)

Baseado em dados disponibilizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) nas regionais dos países das Américas, da Ásia e do Pacífico ocidental a incidência de DENV aumentou 30 vezes nos últimos 50 anos. Estima-se que até 390 milhões de infecções ocorram anualmente em mais de 152 países endêmicos, colocando em risco quase metade da população mundial (Figura 4) (BHATT *et al.*, 2013; BRADY *et al.*, 2012; SUKHRALIA *et al.*, 2019). Atualmente, a doença é de grande preocupação dentre as questões relacionadas à

saúde global dado que aproximadamente 100 milhões de pessoas estão em risco de infecção em cada ano (BARROWS *et al.*, 2018; BRADY *et al.*, 2012). O relatório epidemiológico mais recente da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), em abril e junho de 2019, informou o registro de 537.585 casos confirmados de DENV no Brasil. Este alto número de ocorrências se deve a uma epidemia recente em estados das regiões sudeste e centro-oeste do Brasil, reportada em fevereiro - junho de 2019 (INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR MEDICAL ASSISTANCE TO TRAVELLERS, 2019).

**Figura 4** - Distribuição mundial do vírus dengue



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and prevention (2019)

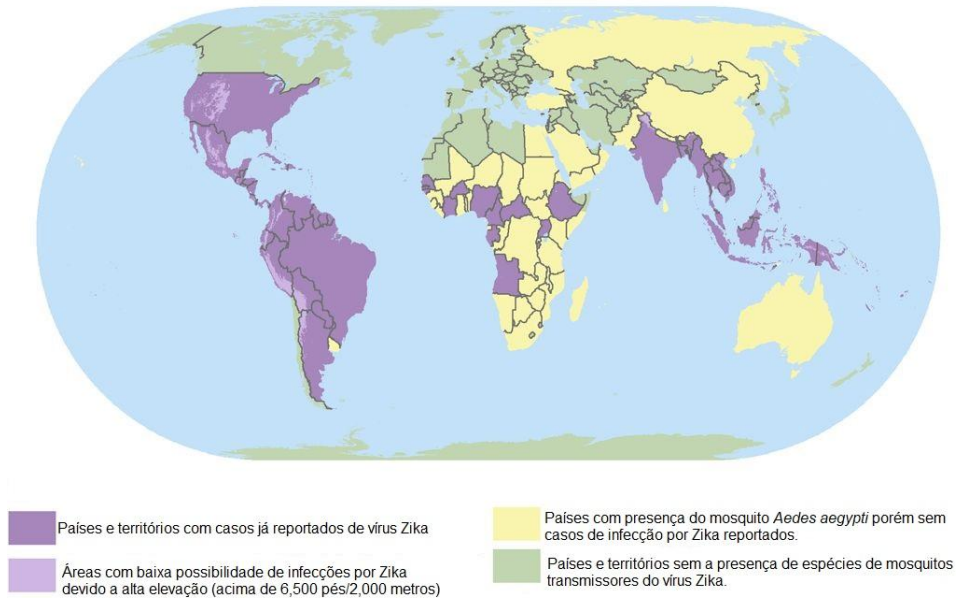
A infecção pelo DENV produz uma gama de desfechos clínicos que classificam a doença, de acordo com orientação da OMS em: Assintomática (dengue sem sinais de alarme), dengue com sinais de alarme até a dengue severa, podendo evoluir para distúrbios hemodinâmicos importantes, febre hemorrágica, choque hipovolêmico e morte. Apesar do importante impacto clínico, econômico e social, não existe tratamento específico contra o DENV. Recentemente, uma vacina viva atenuada nomeada Dengvaxia – Sanofi Pasteur foi licenciada para a prevenção da doença, mas a vacina ainda não está amplamente disponível à população (COUDEVILLE *et al.*, 2016) e além disso confere apenas proteção cruzada parcial para os quatro sorotipos do DENV (GARCÍA *et al.*, 2017).

A forma mais eficaz de evitar esta e outras arboviroses, por enquanto, é através do combate aos mosquitos transmissores. Contudo, o controle e a erradicação do dengue através do enfrentamento ao vetor têm se tornado cada vez mais difícil devido ao crescimento urbano, ao grande aumento das viagens domésticas e internacionais, dentre outros fatores (GOULD *et al.*, 2017; GUZMAN *et al.*, 2010;).

#### 2.1.4 Vírus Zika e doenças associadas

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na Floresta de Zika em Uganda (BARROWS *et al.*, 2018; DICK *et al.*, 1952;). Entre março de 2015 até o final de janeiro de 2016, mais de 20 países relataram surtos do ZIKV (AGUMADU; RAMPHUL, 2018). Em novembro de 2015, uma acumulação de casos de microcefalia no Brasil foi associada à epidemia de ZIKV, e então o vírus ganhou destaque no cenário da saúde pública mundial (BARROWS *et al.*, 2018). Em fevereiro de 2016 a OMS classificou a doença como emergente e de grande preocupação para a saúde pública mundial devido à disseminação autóctone de maneira rápida e descontrolada (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2019). Atualmente o vírus é considerado endêmico em 79 países (Figura 5) (SUKHRALIA *et al.*, 2019). O mais recente boletim epidemiológico da SVS, referente ao período de abril - junho de 2019 indicou 1.362 confirmados de Zika no Brasil. Sendo 59 casos confirmados em gestantes.

**Figura 5** - Distribuição mundial do vírus Zika.



Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and prevention (2019)

O ZIKV é transmitido ao homem através da picada de um mosquito infectado do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor. Em uma pesquisa feita no Brasil demonstrou-se que o ZIKV pode ser transmitido pelo mosquito *Culex quinquefasciatus* (GUEDES *et al.*, 2017); porém mais estudos são necessários para definir o papel desse mosquito na dispersão do ZIKV em condições naturais. Além da transmissão por mosquitos vetores, o ZIKV também pode ser transmitido homem-homem, por transmissão vertical da mulher ao feto durante a gestação e por transmissão sexual através do sêmen (MATUSALI *et al.*, 2018; MEAD *et al.*, 2018; STOWER, 2018.).

Em relação aos sintomas clínicos a maioria das infecções causadas pelo vírus Zika é assintomática (aproximadamente 80%) (CHANG *et al.*, 2016). Quando há sintomas o ZIKV vírus apresenta-se como uma virose clássica: febre, erupção cutânea, artralgias e conjuntivite não purulenta, similar a sintomatologia de DENV e outras arboviroses, porém como agravante o vírus Zika é considerado fator necessário para o desenvolvimento de distúrbios neurológicos severos (AGUMADU; RAMPHUL, 2018; CHANG *et al.*, 2016; SUKHRALIA *et al.*, 2019).

De acordo com a Organização Pan-americana de Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) em julho de 2015, o Brasil notificou uma possível associação entre a

infecção pelo ZIKV e a síndrome de Guillain-Barré em adultos (NÓBREGA *et al.*, 2018) e em outubro de 2015 uma associação entre a infecção pelo ZIKV e amicrocefalia. Esta última correlação foi posteriormente confirmada categoricamente e classificada de maneira mais específica como Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) (MARTINS *et al.*, 2018). A SCZ é definida como o conjunto de deficiências congênitas encontradas entre fetos e bebês infectados (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

Atualmente, não existe tratamento profilático específico ou uma vacina contra o ZIKV (AGUMADU; RAMPHUL, 2018). Um dos desafios para o desenvolvimento de terapias antivirais e vacinas contra o ZIKV é a necessidade de atender aos grupos principais: mulheres grávidas e outras populações de alto risco (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017). A inativação do vírus deve apresentar um nível seguro para estes indivíduos e ao mesmo tempo ser capaz de induzir resposta imune necessária para garantir a proteção ao vírus (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017).

#### 2.1.5 Terapia antiviral contra os vírus dengue e Zika

Considerando a ausência de vacinas licenciadas e disponíveis, e de drogas com uso terapêutico específico, medicações com propriedades antivirais são necessárias (BOLDESCU *et al.*, 2017; DE CLERQ; GARCIA *et al.* 201; LI, 2016). No caso do vírus Zika esta ausência é ainda mais significativa. As ainda escassas informações sobre a biologia ou imunidade do vírus, a presença de outros *Flavivirus* cocirculantes, como por exemplo, o DENV, e a necessidade de proteger as mulheres grávidas são alguns dos principais desafios que estão no caminho do desenvolvimento de vacinas e antivirais contra o ZIKV (WAHID *et al.*, 2017). O neurotropismo característico deste e de outros *Flavivirus* influencia diretamente no *design* dos compostos antivirais, pois a penetração da barreira hematoencefálica se torna uma propriedade farmacocinética crucial, particularmente em casos de neuroinfecção persistente (BOLDESCU *et al.*, 2017). Para o DENV, o desafio no desenvolvimento de antivirais está ligado à febre hemorrágica causada pelo vírus, a qual tem seu progresso dependente da resposta imune do hospedeiro (BOLDESCU *et al.*, 2017; PAESSLER; WALKER, 2013). Conseqüentemente, desenvolver antivirais com propriedade imunomoduladoras e anti-hemorrágicas é importantes para evitar o desenvolvimento de agentes sintomáticos; no entanto, os agentes antivirais projetados atualmente são eficazes apenas para prevenir o início da febre (BOLDESCU *et al.*, 2017). Entender os determinantes virais específicos para o



desenvolvimento da febre hemorrágica axiliaria no entendimento do mecanismo sintomático e portanto na busca por drogas atuantes; entretanto estes fundamentos ainda não foram definidos (BOLDESCU *et al.*, 2017).

A busca principal é por drogas antivirais que possam reduzir a viremia durante etapas iniciais da infecção, bloquear a infecção em tecidos e células específicas no caso das encefalites e do ZIKV, por exemplo; ou modular a resposta imune para prevenir ou tratar as diferentes doenças causadas por ambos os vírus. (BRAY - 2008). Outro critério também extremamente importantes na investigação de um composto é uma atividade promissora comprovada contra mais de um *Flavivirus* de interesse atual considerável, como DENV e o ZIKV (BOLDESCU *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, as estratégias para desenvolvimento de drogas antivirais têm se concentrado no desenvolvimento de inibidores de replicação dos vírus (GARCÍA *et al.*, 2017). Estes mecanismos são projetados para atuar nas proteínas que compõem o genoma do vírus, tendo como principais alvos as que possuem função enzimática, como NS3 e NS5 (GARCÍA *et al.*, 2017; KOEHN; CARTER, 2005). Estas proteínas compõem papel integral no complexo de replicação viral, pois estão envolvidas no processamento da poliproteína, na síntese do genoma de RNA viral, na metilação da cap 5', entre outras atividades (KOEHN; CARTER, 2005). A proteína NS5 recebe destaque como alvo para os antivirais, pois é a mais altamente conservada entre as proteínas não-estruturais dos *Flavivirus* (CHANG *et al.*, 2016; HU; SUN, 2019). Esta proteína possui um domínio de metiltransferase N-terminal (MTase) requerido para o encapsulamento de RNA e um domínio de RNA polimerase dependente de RNA C-terminal (RdRp) que funciona como RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável, portanto pela síntese do RNA viral (CHANG *et al.*, 2016; HU; SUN, 2019). A protease NS3, composta por uma serina protease N Terminal e uma helicase C-terminal e também é um alvo promissor de drogas para inibir a replicação viral, pois junto com a ação, de seu cofator NS2b, é responsável pela montagem do complexo de replicação do genoma viral e também tem papel importante no processamento da poliproteína. (BOLDESCU *et al.*, 2017; GARCÍA *et al.*, 2017; HU; SUN, 2019)

Considerando que os *Flavivirus* afetam as células hospedeiras de diversas formas os componentes da célula hospedeira também devem ser estudados como alvo para a terapia antiviral. Enquanto que algumas vias celulares podem ser reguladas positivamente para promover a replicação, outras funções, particularmente àquelas relacionadas à resposta imune celular, podem ser suprimidas pelo vírus (ALI *et al.*, 2017; BOLDESCU *et al.*, 2017; MUNJAL *et al.*, 2017). Assim sendo a célula infectada, suas moléculas, estruturas e mecanismos dever ser analisados como uma rota conceitualmente promissora para o tratamento antiviral. Entender as relações entre o vírus e a célula hospedeira é importante para elucidar o ciclo de vida do vírus e sua consequente patogenicidade (SAMPATH; PADMANABHAN, 2010).

Dentre as drogas que estão em *status* de ensaio clínico ou já aprovadas para uso podemos destacar compostos e moléculas, como por exemplo, a ribavirina um composto sintético, análogo de nucleosídeo, constituído por uma base, por uma pentose, uma a ribose ou desoxirribose (GANE; *et al.*, 2013); sofosbuvir, um análogo de nucleotídeo, constituído por uma base, uma pentose, uma a ribose ou desoxirribose e um grupamento fosfato (MUMTAZ; *et al.*, 2017), ou o já conhecido antiparasitário, a Ivermectina (CRUMP; OMURA, 2011; MASTRANGELO; *et al.*, 2012). Estas substâncias já patenteadas têm sido usadas com o objetivo de inibir proteínas de vários vírus da família Flaviviridae e como consequência tratar, prevenir e aliviar infecções causadas por WNV, DENV, ZIKV, HCV e JEV, por exemplo. (Quadro 1) (BRECHER; *et al.*, 2013; GARCÍA; *et al.*, 2017).

Em relação aos produtos naturais com potencial antiviral, diferentes compostos isolados estão atualmente disponíveis provenientes de extratos naturais, como por exemplo, os flavonóides bacalein, quercetin e narigin; outros como a curcumina, o epigallocatechin-3-gallate, o ácido chebulágico e punicalagina, e o celgosivir, entre outros (Quadro 1) (ABD KADIN; *et al.*, 2013; JASSIM; NAJI; 2003; LIN; *et al.*, 2013). Estas substâncias se apresentam como boas opções para o desenvolvimento de drogas com possível uso clínico; pois interferem em um ou mais dos processos dinâmicos da biossíntese viral (EL SAYED - 2000). Além dos mecanismos de ação intracelulares clássicos; a ação de inativação do vírus quando este se encontra no meio extracelular, também deve ser considerado no estudo de antivirais (EL SAYED - 2000).



Anticorpos monoclonais; como por exemplo, o tyzivumab (Quadro1) vacina inativada e purificada, vacina de DNA plasmidial DNA e outras drogas antivirais são ferramentas promissoras como terapêuticos devido à sua capacidade de promover proteção substancial contra a infecção pelos *Flavivirus* em modelos *in vivo*, e também *in vitro* (WAHID *et al.*, 2017). Além de destas opções, algumas outras técnicas e métodos para a busca por compostos com potencial terapêutico podem ser citados: o mapeamento de peptídeos vaporizados, a análise de pequenas moléculas de origem natural, polímeros conjugados em peptídeos e nanotubos automontáveis são exemplos de tecnologias recentes que podem ser usadas como estratégias antivirais (BOTTING; KUHN, 2012).

**Quadro 1** - Drogas antivirais atualmente disponíveis para o combate dos principais vírus da família Flaviviridae.

(Continua)

Droga	Vírus	Mecanismo de ação	Origem/ Classificação	Progresso do Estudo	Referência
Ribavirina	ZIKV e outros vírus de RNA	Interfere na síntese de trifosfato de guanosina, inibindo o capeamento do RNA mensageiro viral. Ainda apresenta ação sobre uma das polimerases dependentes de RNA	Análogo de nucleosídeo	Para alguns vírus de DNA e RNA (Exemplo HCV): Aprovado	CARVALHO <i>et al.</i> ; 2017 DE CLERCQ - 2004
Favipiravir ou T705	Ebola e outros vírus de RNA	Inibe de forma seletiva a RNA polimerase - dependente de RNA. Ainda induz mutações do tipo transversão, causando a produção de fenótipos virais não viáveis		Para Ebola: Aprovado	FURUTA <i>et al.</i> , 2009 HUCHTING <i>et al.</i> , 2019 KIM <i>et al.</i> , 2018

**Quadro 2** - Drogas antivirais atualmente disponíveis para o combate dos principais vírus da família Flaviviridae.

(Continuação)

Baicaleina	DENV 2 ZIKV	Apresenta atividade virucida contra o vírus na região extracelular. Impede a adsorção viral à célula hospedeira. Ainda inibe a infecção viral após a entrada na célula	Flavonóides derivado da planta <i>Scutellaria baicalensis</i>	Aprovado	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2017 OO <i>et al.</i> , 2019 MOGHADDAM <i>et al.</i> , 2014
Curcumina	Vírus da Hepatite C (HCV), ZIKV, DENV 2 e Chikungunya	Impede a adsorção viral à célula hospedeira. No caso do HCV: Inibe a replicação viral a partir da supressão da via Akt-SREBP-1	Principal componente ativo do açafrão-da-terra ( <i>Curcuma longa</i> )		BALASUBRAMANIAN <i>et al.</i> , 2019 GARCÍA <i>et al.</i> , 2017 MOUNCE <i>et al.</i> , 2017 PADILLA <i>et al.</i> , 2014 PRADITYA <i>et al.</i> , 2019
Delphinidina	ZIKV, DENV e WNV	Impede a adsorção entrada do vírus na célula hospedeira.	Polifenol		SHARMA <i>et al.</i> , 2017 VÁZQUEZ-CALVO <i>et al.</i> , 2017
Quercetina	DENV-2 e ZIKV	Tem ação na replicação viral. Inibição do sítio alostérico da protease NS2B-NS	Flavonóide comumente encontrado em vegetais de frutas	Aprovado	MUNJAL <i>et al.</i> , 2017 SAEYD; 2000

**Quadro 3** - Drogas antivirais atualmente disponíveis para o combate dos principais vírus da família Flaviviridae.

(Continuação)

Epigallocatec hin-3-gallate	HCV, ZIKV, DENV, WNV e JEV	Impede a adsorção entrada do vírus na célula hospedeira.	Polifenol presente em folhas de chá- verde		LIN <i>et al.</i> , 2013 MEKKY <i>et al.</i> , 2019 SHARMA <i>et al.</i> , 2017 WANG <i>et al.</i> ., 2018
Naringenina	DENV-2	Impede a atividade de adsorção e entrada do vírus na célula hospedeira.	Flavonóide, da classe das flavonas encontrado em frutas cítricas.	Aprovado	FRABASILE <i>et al.</i> , 2017 SALEHI <i>et al.</i> , 2019 ZANDI <i>et al.</i> , 2011
Narasina	DENV-2	Induz a quebra da síntese das proteínas virais, porém não atua no processo de replicação.	Ionóforo		LIN <i>et al.</i> , 2013 LOW <i>et al.</i> , 2011
Ácido chebulágico e punicalagina	DENV-2 HCV	Inativa partículas virais livres (porém não impede a infecção célula- célula).  Inibe as fases de adsorção e entrada do vírus	Taninos hidrolizáveis isolados da planta <i>Terminalia chebula</i> Retz. ( <i>T. chebula</i> )		LIN <i>et al.</i> , 2013
Sofosbuvir + Ribavirina	HCV	Inibe as atividades das polimerases NS5B e NS5A	Sofosbuvir: Um análogo de nucleotídeo da classe dos fosforamidato  Ribavirina: Análogo de nucleosídeo	Fase 2 (HCV)	GANE <i>et al.</i> , 2013 WU <i>et al.</i> , 2019

**Quadro 2** - Drogas antivirais atualmente disponíveis para o combate dos principais vírus da família Flaviviridae.

(Conclusão)

Sofosbuvir	ZIKV DENV	Inibidor das atividades da polimerase	Um análogo de nucleotídeo da classe dos fosforamidato	Aprovado	MUMTAZ <i>et al.</i> , 2017 XU <i>et al.</i> , 2017
Sofosbuvir + velpatasvir	HCV	Inibe as atividades das polimerases NS5B e NS5		Fase 3 - Completa	ASSELAH <i>et al.</i> , 2019 DE CLERQ; LI, 2016
Ivermectina	DENV YFV	Pode estar envolvida no ciclo catalítico da helicase e, portanto, pode ser usado como alvo para inibição enzimática	Um derivado dihidro da avermectina; originária de microrganismo isolado do solo	Para DENV Tratamento de 2 dias: Fase 2 Tratamento de 3 dias: Fase 3 Para YFV: Aprovado	CRUMP; OMURA, 2011 MASTRANGELO <i>et al.</i> , 2012 XU <i>et al.</i> , 2018 CLINICAL TRIALS, 2015
Tyzivumab	ZIKV	O anticorpo tem como alvo a proteína E (envelope) exposta na superfície do vírus	ZIKV Anticorpo monoclonal (mAb)	Fase 1	CLINICAL TRIALS, 2018
Celgosivir	DENV	Inibidor da alfa-glucosidase associada ao retículo endoplasmático	Éster derivado da castanospermina, um composto encontrado na castanha australiana ( <i>Castanospermum australe</i> )	Fase 1	LOW <i>et al.</i> , 2017

Fonte: A autora

De acordo com o Food and Drug Administration (2006) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2019): As etapas para a aprovação de uma nova droga se inicia com os estudos *in vitro* e *in vivo*, após os aspectos de segurança terem sido avaliados e a aprovação nos testes não-clínicos ter sido concedida; inicia-se a pesquisa clínica, a qual é dividida em quatro fases, as quais ocorrem uma após a outra, até que o maior volume possível de informações sobre o medicamento seja obtido.

- a) Fase 1: Refere-se ao uso do medicamento pela primeira vez em um ser humano são avaliadas diferentes vias de administração e diferentes doses, além de testes iniciais de segurança e de interação com outras drogas ou álcool. Cerca de 20 a 100 indivíduos devem participar dessa fase.
- b) Fase 2: Cerca de 100 a 300 indivíduos que têm a doença ou condição para a qual o procedimento está sendo estudado participam desta fase, o objetivo é obter mais dados de segurança e começar a avaliar a eficácia do novo medicamento.
- c) Fase 3: Nesta fase são realizadas avaliações multicêntrico e uma média de 5 a 10 mil pacientes, devem participar dependendo da patologia em questão, a fase também tem uma maior duração, nesta etapa o novo medicamento é comparado a outros tratamentos existentes para o mesmo problema, ou com um placebo. Os testes de fase 3 devem fornecer informações necessárias para a elaboração do rótulo e da bula do medicamento. A análise dos dados obtidos na fase 3 pode levar ao registro e aprovação para uso comercial do novo medicamento.
- d) Fase 4 (Farmacovigilância): Nesta fase o medicamento já está aprovado e pode ser levado ao mercado, testes de acompanhamento de seu uso são elaborados, possibilitando o conhecimento de detalhes adicionais sobre a segurança e a eficácia do produto. O objetivo principal nesta fase é detectar e definir efeitos colaterais previamente desconhecidos ou ainda não qualificados, assim como os fatores de risco relacionados.

## 2.2 GEOPRÓPOLIS

A geoprópolis um tipo especial de própolis, apresenta características sensoriais similares às encontradas na própolis, que é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* (Figura 6) (SOUZA, F *et al.*, 2013). Tradicionalmente, a geoprópolis tem sido utilizada pela população rural no combate das doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, fortificantes e agentes bactericidas (SOUZA, S.,2012, 2016). Nas regiões tropicais da América do Sul encontram-se espécies nativas de abelhas sem ferrão (gênero *melipona*) que coletam geoprópolis (SOUSA, D.*et al.*, 2015). Dentre estas, destacamos a abelha da espécie *Melipona subnitida* Ducke, “jandaira” presente no nordeste brasileiro (Figura 7).

**Figura 6** - Geoprópolis produzida pela abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida*)



Fonte: Souza, S. (2016)

As abelhas *melipona* utilizam a geoprópolis para a construção e proteção dos seus ninhos contra inimigos. A resina confere isolamento térmico, estabilidade a estrutura do ninho/colônia e proteção química contra o ataque de organismos invasores através da manutenção de um ambiente interno asséptico, evitando o desenvolvimento e disseminação de patógenos bacterianos e fúngicos. (PATRICIO *et al.*, 2002; ROUBIK, 2006; STEARMAN *et al.*, 2008)

**Figura 7** - Abelha sem ferrão jandaira (*Melipona subnitida* Ducke)



Fonte: Souza, S. (2012)

A mistura peculiar de diversos materiais, tais como resinas vegetais, lama, substratos de solo e terra, formam a geoprópolis, uma combinação de cera-resina, o cerume, de consistência dura e coloração característica do barro da região. (REGO; ALBUQUERQUE, 2006). O termo geoprópolis, criado inicialmente pelo Professor Paulo Nogueira-Neto em 1997 incluiu o prefixo “geo” (devido da incorporação de terra e substratos de solo, característica das abelhas *melipona*) à expressão “própolis” (BURDOCK; 1998; SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010)

A maior parte dos estudos científicos tem como foco, estudar a capacidade terapêutica da própolis proveniente de abelhas da espécie *Apis mellifera*, a qual possui, portanto, atividades biológicas muito bem descritas (SOUZA, F *et al.*, 2013). Ao contrário, para outros tipos de própolis, como por exemplo, a geoprópolis produzida pelas abelhas do gênero *melipona*, não existem amplos estudos, por consequência, suas possíveis atividades terapêuticas são desconhecidas.

A geoprópolis produzida pela abelha jandaira (*Melipona subnitida* Ducke), possui grande potencial terapêutico considerando suas propriedades, características naturais e a presença de compostos bioativos em sua composição (SOUSA, D.*et al.*, 2015). Apesar de algumas atividades farmacológicas já terem sido demonstradas, pouco se sabe sobre a geoprópolis (FRANCHIN *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2017; SOUSA, D.*et al.*, 2015). A

composição química da resina e, portanto, as atividades biológicas atribuídas, variam de acordo com a especificidade da flora local, a diversidade geográfica e a variedade genética da abelha rainha (SOUZA, F *et al.*, 2013). Os estudos nesta área, portanto, devem ser elaborados de forma específica, em concordância com as diferentes regiões onde a abelha é encontrada.

### 2.3 MILONA

*Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae) é uma espécie vegetal encontrada no nordeste e sudeste do Brasil (CERQUEIRA-LIMA *et al.*, 2010). Uma infusão de água quente das folhas e da casca da raiz de *C. sympodialis* (Figura 8) é largamente usada na medicina indígena e popular para tratar vários distúrbios inflamatórios, doenças do aparelho respiratório, reumatismos e artrites (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006). A espécie é conhecida popularmente como “milona”, “jarrinha”, “orelha-de-onça” e “abuteira” (PORTO *et al.*, 2008). A partir deste conhecimento empírico tornou-se importante a realização de estudos não-clínicos tendo como objetivo a investigação das possíveis atividades farmacológicas desta planta (MELO *et al.*, 2003).

**Figura 8** - Raiz da planta milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.)



Fonte: A autora

A família Menispermaceae foi estabelecida por Al de Jussieu em 1789 (JUSSIÉU - 1789). As espécies pertencentes a esta família são encontradas em todos os continentes, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No Brasil a família Menispermaceae apresenta 12 gêneros e 106 espécies, a grande maioria delas, dispersa na Amazônia (BARROSO - 1798). Do ponto de vista químico, a família Menispermaceae tem



em sua constituição vários tipos de alcaloides. Aqueles pertencentes ao grupo dos bisbenzilisoquinolínicos (BBI) derivam-se do esqueleto benziltetrahydroisoquinolínico (BARBOSA-FILHO - 2002). O perfil de alcaloides derivados deste grupo é constituído por vinte e três grupos, perfazendo um total de 1522 alcaloides isolados no período de 1970 a 1997, sendo os mais abundantes os BBI (604 do total), seguidos pelos aporfínicos (303) e protoberberínicos (275) (ARAGÃO - 2002). O gênero tem seus alcaloides representantes derivados do núcleo isoquinolínico (IQ), com as 53 bases descritas na literatura pertencentes a 7 tipos de esqueletos diferentes (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1997). Dentre os pertencentes ao grupo dos isoquinolínicos destacam-se: milonina (FREITAS *et al.*, 1995), warifteína; o mais abundante; (CORTES *et al.*, 1995), metilwarifteína e laurifolina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1997), liriodenina e roraimina (LIRA *et al.*, 2002).

*Cissampelos sympodialis*, é uma espécie de grande importância na farmacologia pelas diversas atividades já confirmadas, como por exemplo, espasmolítica, atribuídos a warifteína e a milonina (FREITAS *et al.*, 1996; MELO *et al.*, 2003). Entretanto, o conhecimento sobre a capacidade antiviral dos alcaloides derivados da milona ainda é escasso. Dentre os poucos registros de atividade antiviral podemos destacar a ação de um dos alcaloides isolados da milona, a warifteína, contra o Vírus Herpes Simples 1 (HSV-1) (NAWAWI *et al.*, 1999).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diante da permanente incidência no Brasil do DENV ao longo dos últimos anos, e da agravante epidemia de ZIKV, ocorrida em 2015, eventos que resultam em significantes consequências clínicas e sociais, buscar medicamentos que atuem de forma múltipla e contra novos alvos patogênicos é uma abordagem promissora, que pode contornar, pelo menos parcialmente, o surgimento de resistência a drogas antivirais já existentes (SAMPATH; PADMANABHAN; 2010). Além disso, a pesquisa com diferentes candidatos antivirais fornece dados importantes para a descoberta de uma alternativa de combate ao ZIKV, DENV e outros vírus similares.

O estudo químico realizado por pesquisadores do laboratório de bioprospecção fitoquímica (Departamento de Ciências Moleculares - Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE), realizou o isolamento e identificação de dois flavonóides: narigenina (SIGMA) e 7-metoxi-narigenina (sakuranetina) (SOUZA - 2012). Este foi o primeiro relato de substâncias isoladas da geoprópolis da proveniente da abelha jandaira. O grupo de pesquisa, orientado pela Dra Tania, também caracterizou a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto (EtOH) e de frações Acetato de Etila (AcOEt) e hexânica da geoprópolis (SOUZA, F *et al.*, 2013). Dentre todos estes compostos, o flavonóide narigenina é o único que já possui atividade antiviral comprovada contra o vírus dengue (FRABASILE *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2019).

Adicionalmente, pesquisadores do Departamento de Farmácia - Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri DepFar/UFVJM, isolaram e caracterizaram através de métodos de separação convencionais – HPLC, novos alcaloides a partir da Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT) da raiz de *Cissampelos sympodialis*, a qual apresenta constituintes ainda não identificados (CAVALCANTI *et al.*, 2014; MARINHO *et al.*, 2013). Dentre os alcaloides obtidos a warifteína foi disponibilizada para teste antiviral devido a sua já conhecida ação contra patógenos como, por exemplo, ação antiparasitária (SILVA, E *et al.*, 2012) e ação anti-inflamatória (LIMA *et al.*, 2014).

A partir do acesso a estes compostos e substâncias o presente tem grande relevância para a saúde pública, pois possibilita a descoberta e o desenvolvimento de novos antivirais a partir de produtos da biodiversidade brasileira: a geoprópolis da abelha jandaira e a planta

milona. Em relação à importância econômica e ambiental destes produtos, a manutenção primária da abelha jandaira está associada à conservação do meio ambiente e a produção de frutos (SILVA, G *et al.*, 2014). As abelhas atuam como agentes polinizadores de plantas silvestres de natureza arbustiva na Caatinga semiárida, além de plantas das regiões de floresta úmida pré-amazônica (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Assim como a conservação da planta milona, que nos permite esclarecer através do conhecimento científico qual o mecanismo de ação biológica atuante na cura ou tratamento da doença; como consequência o conhecimento empírico, no qual o uso de plantas medicinais tem base, pode então obter comprovação técnico – científica (BEZERRA-SANTOS *et al.*, 2006).

No melhor de nosso conhecimento, o estudo descrito aqui é inédito uma vez que as possíveis atividades antivirais do extrato, frações e substâncias derivadas da geoprópolis e do extrato, fração, picos e substâncias isoladas da milona ainda não foram investigadas contra vírus de RNA. O conhecimento gerado permitirá a expansão deste estudo inicial frente a outros vírus de interesse para a saúde humana e animal. Ademais, espera-se que o conhecimento gerado com o estudo estimule o estabelecimento de práticas sustentáveis de exploração da geoprópolis e da milona e contribua para a melhor convivência do homem com o meio ambiente e para a preservação dos diferentes biomas brasileiros.

#### **4 HIPÓTESE**

O extrato EtOH, a frações hexânica e AcOEt e as substâncias obtidas a partir da geoprópolis da abelha Jandaira (*Melipona subnitida* Ducke, 1911) e o extrato, a FAT e as substâncias obtidas da planta milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) apresentam atividade antiviral contra os vírus DENV e ZIKV.

## 5 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial antiviral do extrato, das frações e das substâncias isoladas da geoprópolis da abelha jandaira e do extrato, fração e substância alcaloides da planta milona frente ao vírus DENV e ZIKV.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar as concentrações não tóxicas do extrato, frações e substâncias isolados da geoprópolis da abelha jandaira e do extrato, fração e substância alcaloides da planta milona em estudo para as células;
- b) Avaliar a atividade antiviral para o vírus DENV-2 do extrato, frações e substâncias isolados da geoprópolis da abelha jandaira e do extrato, fração e substância alcaloides da planta milona em tratamento pós-infecção;
- c) Avaliar a atividade antiviral para o vírus ZIKV do extrato, frações e substâncias isolados da geoprópolis da abelha jandaira e do extrato, fração e substância alcaloides da planta milona em tratamento pós-infecção.

## 6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Sobre a metodologia usada neste estudo

### 6.1 EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS

O processo de obtenção e isolamento dos extratos e substâncias da geoprópolis da abelha jandaira já foi descrito anteriormente (SOUZA - 2012). Os extratos e substâncias foram gentilmente cedidos pela Dr<sup>a</sup>. Tania Maria Sarmento da Silva (UFRPE).

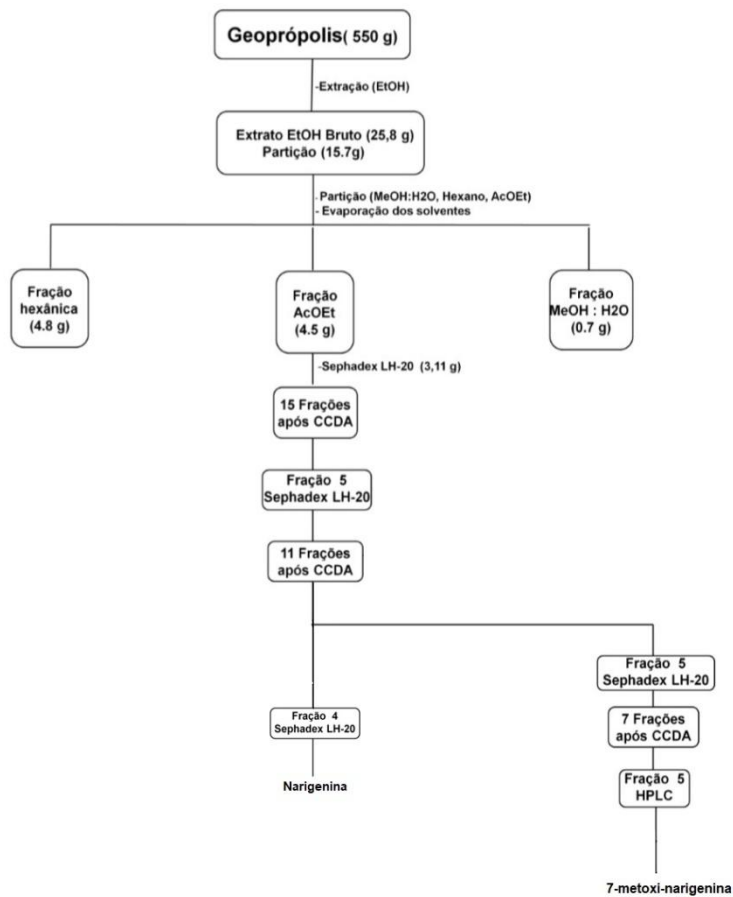
Para este estudo foram coletadas oito amostras de geoprópolis das abelhas jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) em março de 2010 (1), junho de 2011(2), janeiro de 2012 (3), abril de 2012 (4), junho de 2012 (5), abril de 2013 (6), maio de 2013 (7) e dezembro de 2013 (8), no Sítio Riacho, que fica localizado no município de Vieirópolis, região semi-árida do estado da Paraíba, Brasil (SOUZA - 2016).

Uma amostra de 550 g da geoprópolis foi triturada em almofariz, em seguida submetida a sucessivas extrações com EtOH. O material extraído foi filtrado (20 vezes reutilizando o solvente após evaporação a 50°C sob pressão reduzida) produzindo o extrato etanólico (25,8 g) (Figura 9). Parte do extrato etanólico (15,7 g) foi dissolvida em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (200 mL) mantida em sonicação por 30 minutos. A solução obtida foi submetida a sucessivas extrações com hexano (5x 150 mL) e acetato de etila (5x 100 mL). As fases obtidas foram filtradas e concentradas em rotavapor, obtendo-se as frações hexânica (4,8 g), acetato de etila (4,5 g) e MeOH:H<sub>2</sub>O (0,7g).

A fração AcOEt mostrou a presença de flavonóides quando revelada com reagente NP (ácido difenilbóricoetanolamina) em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e uma alíquota (3,11 g) foi submetida à coluna cromatográfica com Sephadex LH-20® usando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (3:7), obtendo-se 15 frações reunidas de acordo com os fatores de retenção (R<sub>f</sub>) observados em CCDA (eluente CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1). A fração 5 da primeira coluna foi recromatografada seguindo o mesmo procedimento, resultando em 11 frações (Figura 9). A fração reunida 4 (15,2 mg), foi recromatografada seguindo o mesmo procedimento obtendo-se a naringenina (11,5 mg) (Figura 10). A fração 5 da segunda coluna foi recromatografada seguindo o mesmo procedimento, obtendo-se 7 frações após CCDA (eluente CHCl<sub>3</sub>:MeOH 9:1). Uma solução da fração 5 a 10 mg/mL em

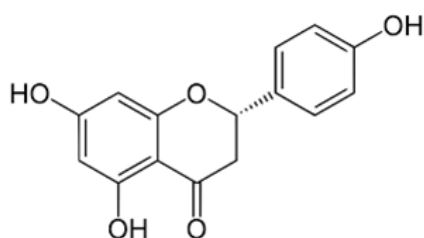
MeOH foi injetada utilizando-se o mesmo sistema de eluição e isolando a substância FA3 (1,5 mg) denominada 7-metoxi-narigenina (SOUSA *et al.* 2015) (Figura 10).

**Figura 9** - Esquema para isolamento das substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina a partir da fração AcOEt da geoprópolis da abelha jandaira.

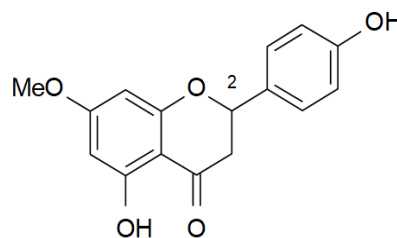


Fonte: A autora

**Figura 10** - Flavonóides isolados da geoprópolis da abelha jandaira.



**Narigenina**



**7-metoxi-narigenina**

Fonte: Adaptado de Souza, S. (2012)

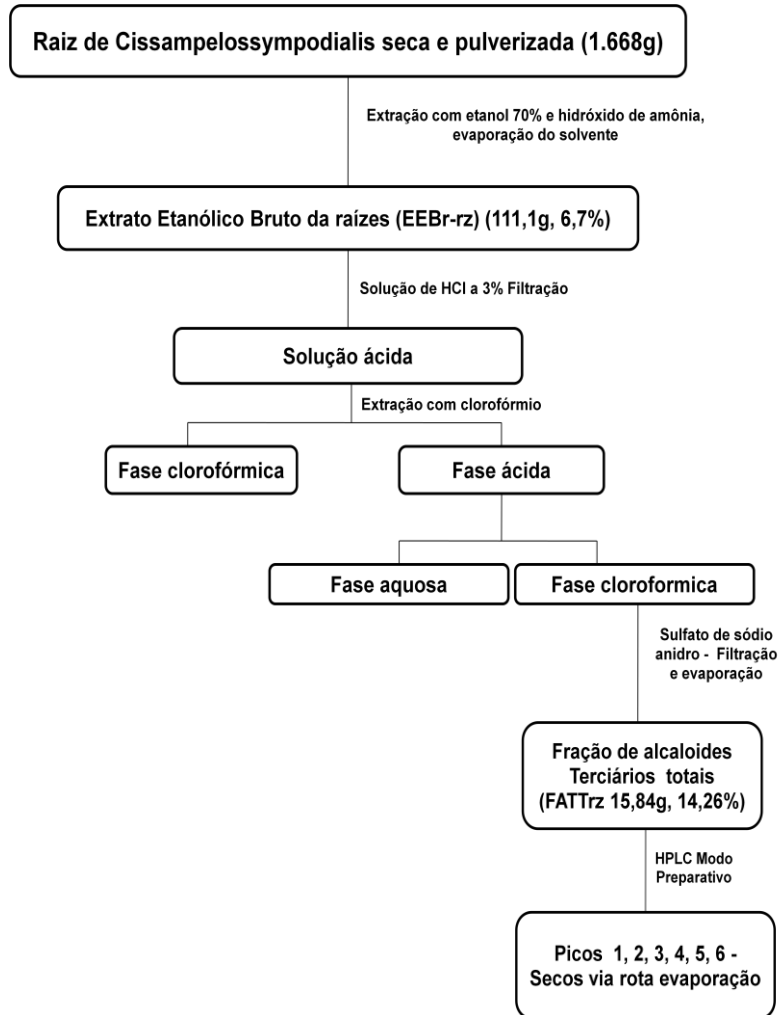
O processo de obtenção e isolamento dos seis picos de alcaloides bisbenzylisoquinolínicos isolados a partir das raízes de milona já foi descrito anteriormente (CERQUEIRA-LIMA *et al.*, 2010). As frações foram gentilmente cedidas pelo Dr. Eduardo de Jesus Oliveira (UFVJM).

Inicialmente foi realizada uma marcha sistemática para isolamento de alcaloides de *Cissampelos sympodialis* Eichl. A fração de alcaloides das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl. foi obtida a partir do extrato etanólico das raízes. As raízes de *Cissampelos sympodialis* (1,688 g) foram coletadas a partir de material vegetal cultivado, secas a 40 °C em estufa com circulação de ar, e trituradas. O material seco e pulverizado foi umedecido com uma solução de hidróxido de amônio e extraído com EtOH por maceração, até teste de alcaloide fracamente positivo. O extrato etanólico foi tratado com uma solução de ácido clorídrico a 3,0 % sob agitação mecânica até obtenção de faixa de pH 2,0-3,0. A solução ácida foi filtrada em funil de Buchner com celite, e em seguida submetida a várias extrações com clorofórmio, objetivando remover principalmente as graxas e outras impurezas apolares. A fase clorofórmica foi reservada. A fase aquosa ácida sofreu basificação com hidróxido de amônio sob agitação mecânica (agitador mecânico com suporte Fisatom, modelo 715) até obtenção de pH 9,0, quando foi extraída de forma exaustiva com clorofórmio até que a reação para alcaloides com o reagente de Dragendorff não fosse mais positiva. A fase aquosa foi descartada e a fase clorofórmica lavada e seca com sulfato de magnésio anidro, e em seguida, evaporada em rotaevaporador a 60 °C, obtendo-se, assim, a fração de alcaloides terciários totais das raízes de *Cissampelos sympodialis* Eichl.



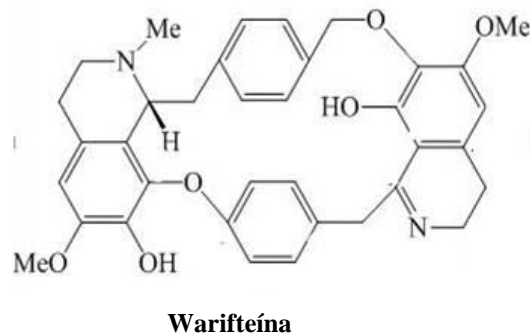
Em seguida foi executado o isolamento dos alcaloides utilizando Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC); um método de separação de compostos químicos em solução, utilizada para identificar e quantificar cada componente em uma mistura. Para isolar os constituintes da fração de alcaloides das raízes de *C. sympodialis* a fração de alcaloides terciários foi solubilizada em uma mistura de MeOH e água (4:1, v/v) e injetada em um cromatógrafo equipado com uma coluna de fase reversa preparativa (25 cm x 2 cm). O método a ser utilizado consistiu de um gradiente de 0-15 min (75 %), 15-20 min (80 %), 20-25 min (100 %),  $\lambda$  máximo de 278 nm, com fase móvel de metanol e água, ambos basificados com amônia para pH 8,0; o fluxo foi de 5,0 mL/min e o tempo total de corrida de 20 minutos. Os picos coletados foram submetidos à extração em fase sólida utilizando cartuchos de fase reversa e eluídas com acetonitrila. O eluente secou através de rotaevaporador com corrente de nitrogênio e foi submetido à análise por técnicas espectroscópicas: IV, Massas, RMN de  $^1\text{H}$  (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13). (Figura 11). O pico 5 foi isolado e caracterizado através destas mesmas análises espectroscópicas sendo definido como warifteína (Figura 12).

**Figura 11** - Esquema para isolamento dos picos 1-6 e da substância warifteína (pico 5) a partir da Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT) da planta milona.



Fonte: A autora

**Figura 12** - Alcaloide isolado da planta milona.



Fonte: Adaptado de Lima *et al.* (2014)

Para os experimentos de avaliação de atividade biológica, os compostos foram inicialmente solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No momento da utilização foi feita a diluição em meio de cultura Dulbecco (DMEM) acrescido de 5% de Soro Bovino Fetal (SBF), de forma que a concentração final de DMSO nos testes *in vitro* foi de no máximo 0,6%, concentração previamente testada e que não apresentou toxicidade considerável contra a linhagem celular utilizada (FELIX - 2014).

## 6.2 CÉLULAS E VÍRUS

As células Vero, linhagem de rim de macaco verde africano, foram cultivadas em meio DMEM, contendo 10% de SBF, penicilina, estreptomicina e anfotericina B, nas concentrações de 100U/mL, 100 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As cepas do vírus representando o sorotipo 2 do DENV e o ZIKV encontram-se disponíveis no Departamento de Virologia da Fiocruz/PE. A cepa do DENV-2 utilizada foi isolada a de pacientes com dengue clássica ou dengue hemorrágica, residentes em municípios localizados nas diferentes regiões geográficas de Pernambuco, em diferentes anos epidêmicos e/ou endêmicoé denominada 3808/BR-PE/95 (GenBank: EU259569). A cepa do ZIKV utilizada foi isolada a partir do sangue de um paciente com doença exantemática no Estado de Pernambuco e é denominada ZIKV/H. sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1).

Ambos os vírus foram titulados pelo método  $\text{TCID}_{50}$  descrito por Reed e Muench (1938), que indica à diluição do vírus que resulta na infecção de 50% do tapete de células, expressando o título viral como a dose 50% infectiva ( $\text{IC}_{50}$ ). Para isso, aproximadamente

$1 \times 10^5$  células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços, e após a adição de diluições seriadas das alíquotas virais, as placas foram incubadas por 72 a 120 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O resultado foi obtido pela análise do efeito citopático (ECP) em microscópio óptico invertido. O sorotipo 2 do DENV possui título de  $1,9 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL, enquanto que o ZIKV possui o título de  $3,4 \times 10^7$  (TCID<sub>50</sub>/mL).

Os estoques virais do sorotipo 2 do DENV e do ZIKV foram produzidos em células Vero. Para isso, 500 µl da suspensão viral foi inoculado em garrafas de cultura (75 cm<sup>2</sup>) contendo células confluentes. Após 1 hora de adsorção do vírus, com leve agitação, foram adicionados às garrafas 15 mL de meio DMEM (suplementado com 2% de SBF) e incubadas a 37 °C por até 72 horas. Após 3-5 dias a suspensão viral foi retirada e centrifugada a 2000-2500 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenados em freezer - 80 °C até a sua utilização.

### 6.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade é a etapa inicial no caso de estudos *in vitro* que tem como objetivo a identificação do possível potencial antiviral de determinado composto. A definição da viabilidade das células em estudo frente ao composto testado definirá o andamento do estudo. Substâncias com alta taxa de toxicidade para as células-alvo são inviáveis no desenvolvimento de drogas antivirais.

A partir deste teste é possível determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos para as células. O objetivo é que as substâncias, frações e extratos testados não causem danos significativos para a cultura de célula infectada. Além disso, foram calculados o CC<sub>50</sub> e o CC<sub>20</sub>, ou seja, a concentração do composto relacionada à 50% e 80%, respectivamente, da viabilidade celular.

A viabilidade celular foi analisada através do método colorimétrico quantitativo baseado na redução do sal de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-212 tetrazoliumbromide]. O sal de tetrazólio é utilizado para indicar a sobrevivência e proliferação de células. O ensaio detecta células vivas, mas não células mortas e o sinal gerado depende do grau de ativação das células (MOSMAN; 1983). O resultado é lido em um espectrofotômetro, o qual gera uma densidade óptica (DO) referente ao número de células viáveis.

Para os testes de citotoxicidade, os extratos e as substâncias isoladas foram solubilizados em DMSO e inoculados em um limiar de concentrações em monocamadas de Vero semeadas em uma concentração de  $1.10^4$  células/poço em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. As células serão incubadas por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  antes do uso. Os ensaios de viabilidade celular serão realizados usando o método colorimétrico do MTT utilizando Kit MTT Cell Proliferation Assay Kit (ATCC, USA), de acordo com o protocolo já validado (CARVALHO *et al.*, 2017). Alíquotas de  $100\mu\text{l}$ , contendo concentrações variadas das substâncias a serem testadas foram dispensadas sequencialmente nas placas de microtitulação. Controles celulares e diferentes concentrações do veículo de solubilização foram incluídos. Após 120 horas de incubação, os meios de cultivo foram removidos e  $1\text{ mg/mL}$  da solução de MTT (preparado imediatamente antes do uso) foi adicionado a cada poço e a microplaca foi incubada durante mais quatro horas a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente a solução com MTT foi removido, o DMSO foi adicionado, causando uma maior permeabilidade das membranas celulares e permitindo, portanto, a solubilização dos sais de formazan, em sequência ocorreu a análise da densidade ótica por leitura em espectrofotômetro com  $560\text{ nm}$  para obtenção da DO de cada tratamento e da concentração de cada composto que resultou em 50% de toxicidade ( $\text{CC}_{50}$ ), a qual foi determinada através de uma curva dose-resposta calculada pelo programa GraphPad Prism e a viabilidade celular pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{média do tratamento}}{\text{média do controle}} \times 100$$

Cada experimento foi repetido independentemente três vezes.

## 6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

Para a avaliação da atividade antiviral dos os extratos e substâncias, protocolos já validados (CARVALHO *et al.*, 2017) foram testados no pós-tratamento, ou seja, neste ensaio as células foram infectadas e após a inoculação viral, o sobrenadante contendo o vírus foi aspirado e a monocamada foi lavada com PBS a pH 3 para que os vírus que não penetraram na célula fossem retirados. Em seguida, as células foram tratadas, ou não, com diluições seriadas dos extratos, frações e substâncias em teste e incubadas por 120 h a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6.4.1 *Screening* antiviral

Para investigar a atividade antiviral das substâncias foi realizado um teste baseado na avaliação da redução do efeito citopático causado pelo vírus nas células. A concentração máxima não tóxica dos extratos e substâncias em testes será adicionada e as placas serão incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por até 72 horas. Além dos tratamentos com os extratos e substâncias em teste, também foi incluído aos controles o tratamento com um composto que possui atividade virucida já comprovada, o 6-metilmercaptipurinaribosídica (6MMPr) (CARVALHO *et al.*, 2017). Este controle foi denominado como positivo. O controle mock (apenas células) também foi incluído em todos os ensaios. Resumidamente, as células Vero foram cultivadas em microplacas de 48 poços e incubadas por 24 horas, após esse período o meio foi aspirado e o DENV ou ZIKV diluído à sua multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 foi inoculado aos poços. Em seguida, as placas foram incubadas por 2 horas, período de adsorção viral. Posteriormente, o meio foi novamente aspirado e a monocamada foi lavada com PBS (phosphate buffered saline, pH 3.0), para retirada das partículas virais que não foram adsorvidas. A concentração máxima não tóxica (CC<sub>20</sub>) dos compostos em testes e suas diluições decrescentes ( $1/2$ ,  $1/4$  e  $1/8$ ) foram adicionadas; e as placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por até 120 horas. O efeito citopático foi observado ao decorrer das 120 horas de incubação. Por fim, o sobrenadante correspondente a cada diluição foi aliqotado e armazenado em freezer -80 °C até a posterior utilização.

#### 6.4.2 Ensaio de titulação viral

Neste ensaio foram utilizados os sobrenadantes correspondentes ao  $CC_{20}$ , e as diluições decrescentes de cada substância testada, ou seja, as concentrações equivalentes a  $1/2$ ,  $1/4$  e  $1/8$  do  $CC_{20}$ , com o objetivo de obter a concentração correspondente ao  $CI_{50}$ , que representa a concentração da substância capaz de inibir o efeito citopático induzido pelo vírus em 50%. Após cinco dias de incubação, a viabilidade das células observada através da observação do efeito citopático, determinando assim a redução ou não do título viral através do ensaio de  $TCID_{50}$  (CARVALHO *et al.*, 2017). Dessa maneira, foi possível determinar a concentração inibitória a 50% ( $CI_{50}$ ). De posse desses valores, tornou-se possível determinar o índice terapêutico ou índice de seletividade ( $IS = CC_{50} / CI_{50}$ ), que reflete a eficácia da substância experimental em inibir a replicação viral comparada a sua capacidade de induzir citotoxicidade e morte celular. É desejável ter um elevado índice de seletividade que produz máxima atividade antiviral e mínima toxicidade celular (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2006).

#### 6.5 DOCKING MOLECULAR

Os cálculos de atracamento molecular (*Docking*) foram feitos com o AutoDock Vina (TROTT; OLSO, 2010). A abordagem de docking molecular tem como objetivo modelar a interação entre uma pequena molécula e uma proteína no nível atômico, o que nos permite caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação de proteínas alvo, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais (MENG *et al.*, 2011). Para executar os cálculos de todas as moléculas geradas utilizamos o script VSDK (BABA; AKAHO, 2011).

Inicialmente, foi realizado o atracamento do composto no receptor, para obter os tipos de interações esperadas e a energia de ligação a ser tomada como referência, além de um cálculo de um inibidor, T5341917, obtido da literatura. (LI *et al.*, 2015) O cálculo entre o substrato e a enzima teve energia de  $-7,3$  kcal/mol, já o cálculo entre o ligante T5341917 e a enzima teve energia de ligação de  $-7,6$  kcal/mol, dando indícios da eficácia do método uma vez que o inibidor deve se ligar mais fortemente que o substrato.

Em seguida, foi executada uma varredura com as moléculas, a partir de modelos farmacofóricos. Depois do atracamento molecular de todas as moléculas, foram avaliados quais compostos se ligaram ao receptor com energia menor ou igual que a energia de ligação do substrato. Uma energia menor ou igual a -8.0 kcal/mol, é considerada espontânea, indicando um contato natural, o qual pode ser considerado como indicativo de uma boa interação antiviral.

## 6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos em cada experimento foram testados quanto à normalidade e comparados utilizando o teste “t –Student” (2 tratamentos) ou ANOVA (mais de 2 tratamentos) usando o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de  $P \leq 0.05$  serão considerados significativos.



## 7 RESULTADOS

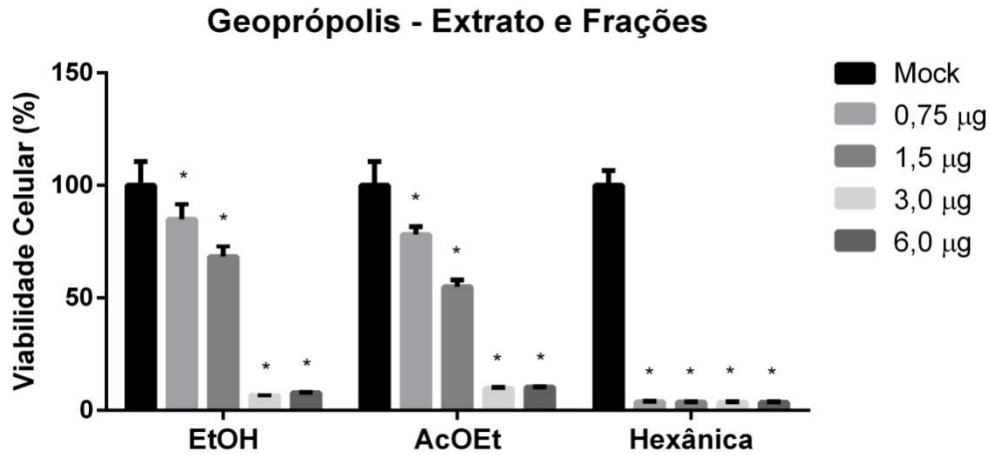
### 7.1 CITOTOXICIDADE

Para os ensaios de citotoxicidade e posteriormente para os ensaios antivirais os extratos, frações e as substâncias testadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 99,9% (DMSO). De acordo com ensaios de citotoxicidade executados pelo grupo de pesquisa, a porcentagem de 0,6% de DMSO no volume total solubilizado, foi determinada como máxima não tóxica para as células Vero, não apresentando influência, portanto, na viabilidade celular.

A escolha do limiar de concentração para cada composto foi definida, considerando a concentração máxima a ser testada, aquela correspondente a 0,6% de DMSO, usado como veículo de solubilização. Os cálculos tiveram como base a massa molar, no caso da substância já isolada; e a concentração de mg/mL no caso dos extratos e das frações, derivadas da geoprópolis ou da milona.

O nível aceito de citotoxicidade que se apresentou no extrato, das frações e das substâncias derivadas da geoprópolis testados foi exclusivamente derivada de resíduos dos solventes utilizados durante o processo de isolamento (fração etanólica – solvente etanol e nas frações Acetato de Etila – solvente acetato e Hexânica – solvente hexano) (Figura 13). Dentre os compostos derivados da geoprópolis, apenas a fração hexânica apresentou alta toxicidade e, portanto, baixa viabilidade celular, sendo então descartada dos testes seguintes (Figura 13).

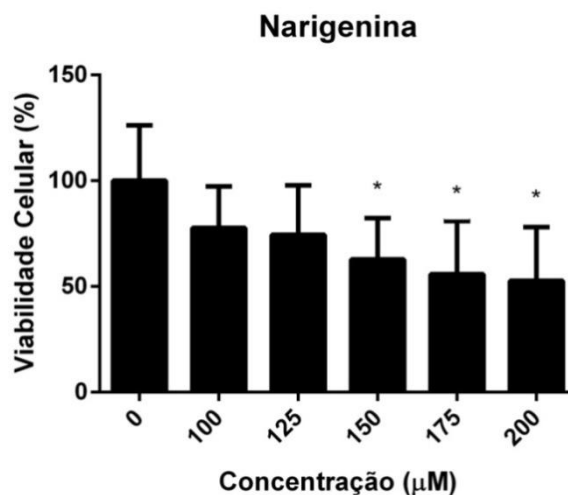
**Figura 13** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o Extrato Etanólico (EtOH) e frações Acetato de Etila (AcOEt) e hexânica da geoprópolis.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 0,75 µg a 6 µg por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Para o controle mock as células foram cultivadas com meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \* $p < 0,05$  Anova unidirecional seguido por teste Dunnett.

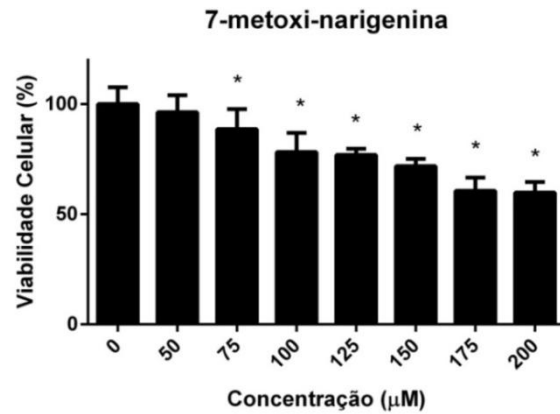
**Figura 14** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o flavonóide narigenina isolado da geoprópolis.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 12,5 µM a 250 µM por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Como controle negativo (mock) foi utilizado meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \* $p < 0,05$  Anova unidirecional seguido por teste Dunnett.

**Figura 15** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o flavonóide 7-metoxi-narigenina isolado da geoprópolis.

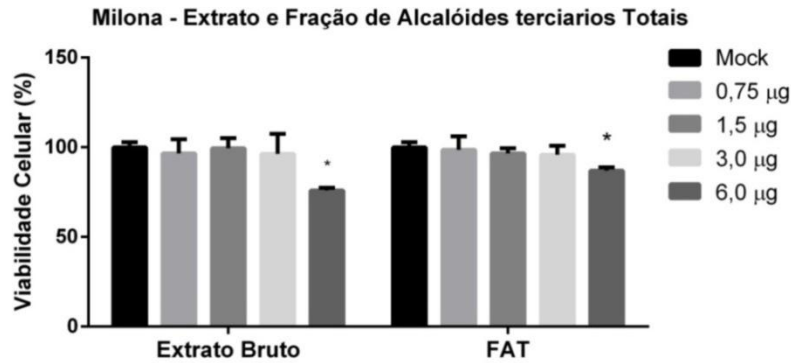


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 50 µM a 200 µM por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Como controle negativo (Mock) foi utilizado meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \***p<0,05 Anova unidirecional seguido por teste Dunnett.**

Em relação à milona a citotóxicidade, também em nível aceitável, do extrato, da fração e da substância testados foi exclusivamente derivada de resíduos dos solventes utilizados durante o processo de isolamento (extrato etanólico - solvente etanol) e Fração de alcaloides Terciários totais (FAT – solvente clorofórmio) (Figura 16).

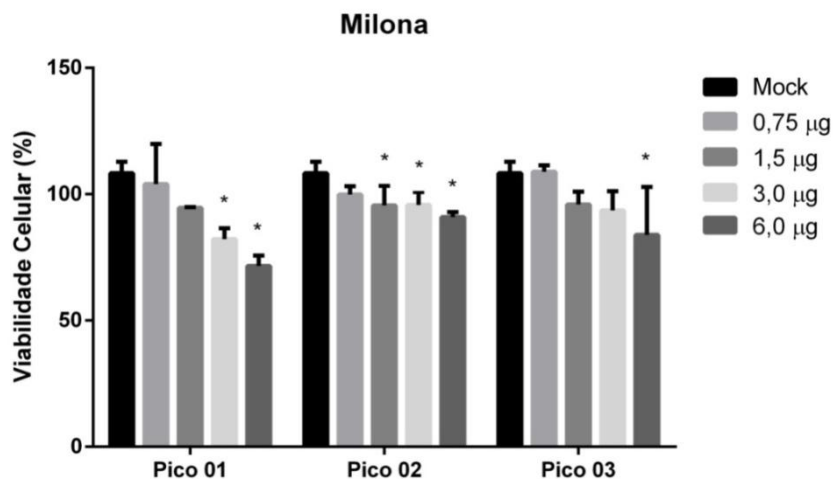
**Figura 16** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o Extrato Bruto e a Fração de Alcalóides terciários Totais (FAT).



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 0,75 µg a 6 µg por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Para o controle Mock as células foram cultivadas com meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \***p<0,05 Anova unidirecional seguido por teste Dunnett**

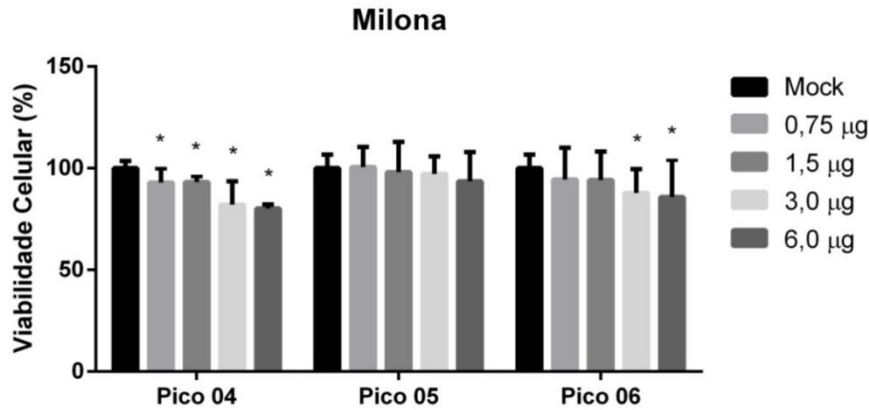
**Figura 17** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com os picos 1, 2 e 3 isolados da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 0,75 µg a 6 µg por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Para o controle mock as células foram cultivadas com meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \***p<0,05. Anova unidirecional seguido por teste Dunnett.**

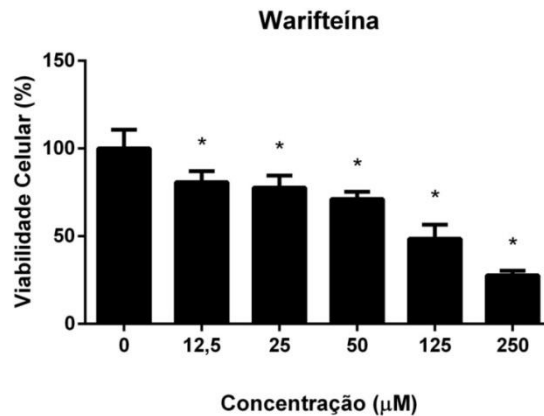
**Figura 18** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com os picos 4, 5 e 6 isolados da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 0,75 µg a 6 µg por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Para o controle mock as células foram cultivadas com meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \* $p < 0,05$ , Anova unidirecional seguido por teste Dunnett.

**Figura 19** - Análise da viabilidade celular após o tratamento com o alcaloide warifteína isolado da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi incubada com concentrações variando de 12,5 µM a 250 µM por 120 horas. Os compostos foram solubilizados em 0,6% de DMSO. Como controle negativo (mock) foi utilizado meio DMEM. Para permitir as comparações, o controle mock foi considerado como 100% de viabilidade. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão de três réplicas biológicas. \* $p < 0,05$  Anova unidirecional seguido por teste Dunnett.

A tabela 1 e a tabela 2 estabelecem a concentração correspondente ao CC<sub>20</sub> dos compostos como sendo a CMNT (concentração máxima não tóxica), ou seja, concentrações que apresentaram 80% de viabilidade celular. A partir desta concentração foi determinado um limiar de concentrações a serem consideradas nos ensaios antivirais posteriores.

**Tabela 1** - Estimativa do CC<sub>50</sub> e CC<sub>20</sub> do extrato, frações e substância isolados da geoprópolis e das frações acaloides isolados a partir da milona em células Vero.

Composto	CC <sub>50</sub>	CC <sub>20</sub>
Extrato EtOH (geoprópolis)	2,47 µg	0,641 µg
Fração AcOEt (geoprópolis)	2,29 µg	0,293 µg
Fração Hexânica (geoprópolis)	10,30 µg	18,76 µg
Extrato bruto (milona)	13,35 µg	5,730 µg
FAT (milona)	24,58 µg	9,820 µg
Pico 01 (milona)	19,72 µg	7,125 µg
Pico 02 (milona)	14,10 µg	5,244 µg
Pico 03 (milona)	23,24 µg	9,580 µg
Pico 04 (milona)	14,77 µg	2,865 µg
Pico 05 (milona)	44,73 µg	18,11 µg
Pico 06 (milona)	21,49 µg	7,894 µg

Fonte: A autora

**Tabela 2** - Estimativa do CC<sub>50</sub> e CC<sub>20</sub> de substâncias isoladas da geoprópolis e da milonaem células Vero.

Composto	CC <sub>50</sub>	CC <sub>20</sub>
Narigenina (geoprópolis)	241,6 µM	86,43 µM
7-metoxi-narigenina (geoprópolis)	240,4 µM	105,2 µM
Warifteína (milona)	150,3 µM	10,49 µM

Fonte: A autora

Devido a limitação da porcentagem de 0,6 % na concentração de DMSO, para a realização do ensaio de *screening* dos testes antivirais subsequentes, a concentração máxima 6 µg, no caso dos extratos, frações e picos foi usada, mesmo quando a concentração máxima não tóxica (CMNT) referente ao CC<sub>20</sub>, apresentou possibilidade do uso de valores maiores (Tabela 1).

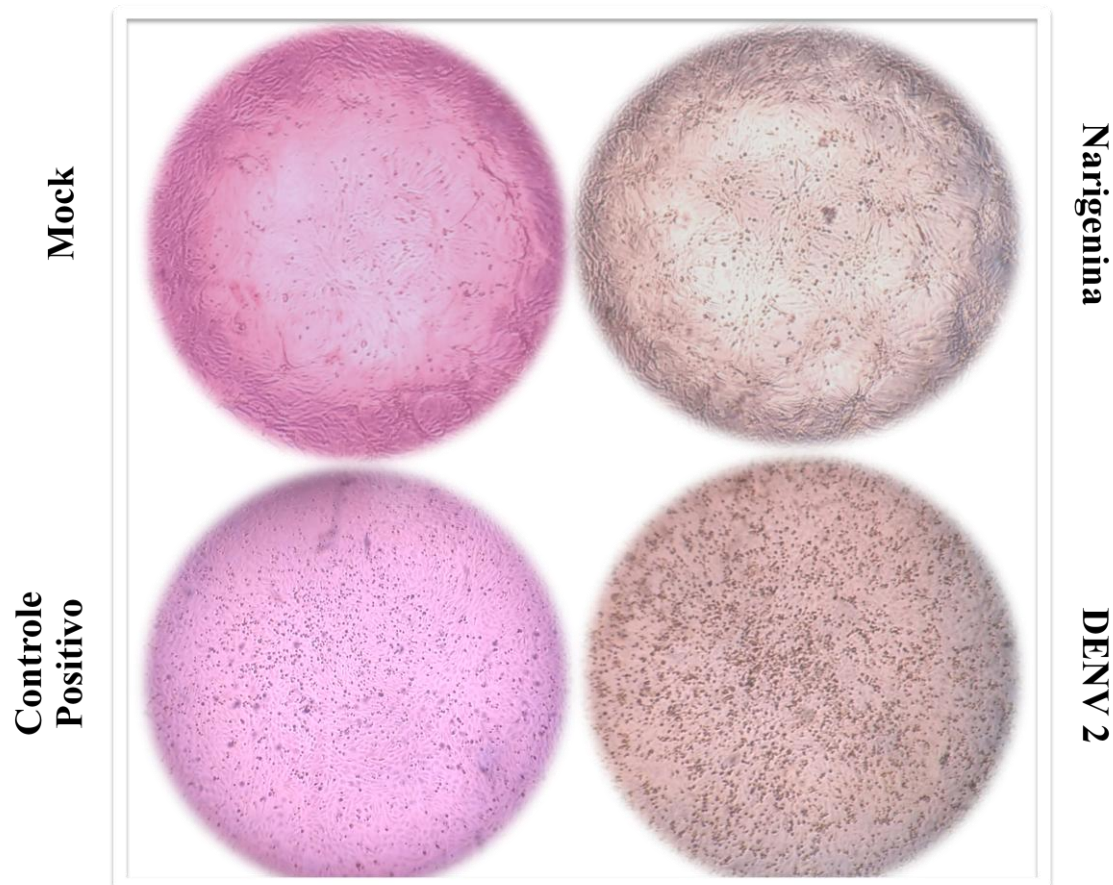
No caso das substâncias isoladas, o cálculo inicial para escolha das concentrações que seriam testadas para a obtenção do CC<sub>20</sub>, permitiu que o limite de 0,6% de DMSO fosse considerado previamente, devido o conhecimento do valor corresponde ao peso molecular (Tabela 2).

## 7.2 SCREENING

As ilustrações a seguir são uma representação da redução do efeito citopático após a infecção com os vírus DENV-2 e ZIKV e o posterior tratamento com a concentração correspondente ao CC<sub>20</sub> de cada uma das substâncias isoladas da geoprópolis e da milona (Tabela 2). O resultado foi obtido pela análise do efeito citopático (ECP) em microscópio óptico invertido. Nos poços com tratamento é possível observar, quando existe o efeito antiviral, a redução na quantidade de células mortas por citólise, com morfologia alterada e lesões significativas (LI; *et al* 2012; SHERMAN; *et al*, 2019). Além destes indicadores, a coloração do meio de cultivo indica o nível de acidez resultante do consumo dos nutrientes disponíveis, sugerindo uma maior ou menor atividade metabólica (SHERMAN; *et al*, 2019).

Após a infecção com o DENV-2 e o subsequente tratamento com as substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina, isoladas da geoprópolis, a monocamada de células apresenta-se saudável. Algumas células mortas ou com morfologia alterada são observadas devido ao estresse celular, porém quando comparado ao controle mock podemos considerar que estes fatores também têm origem espontânea em decorrência da indução natural de apoptose devido à falta de nutrientes disponíveis (Figura 20 e 21).

**Figura 20** - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o flavonóide Narigenina

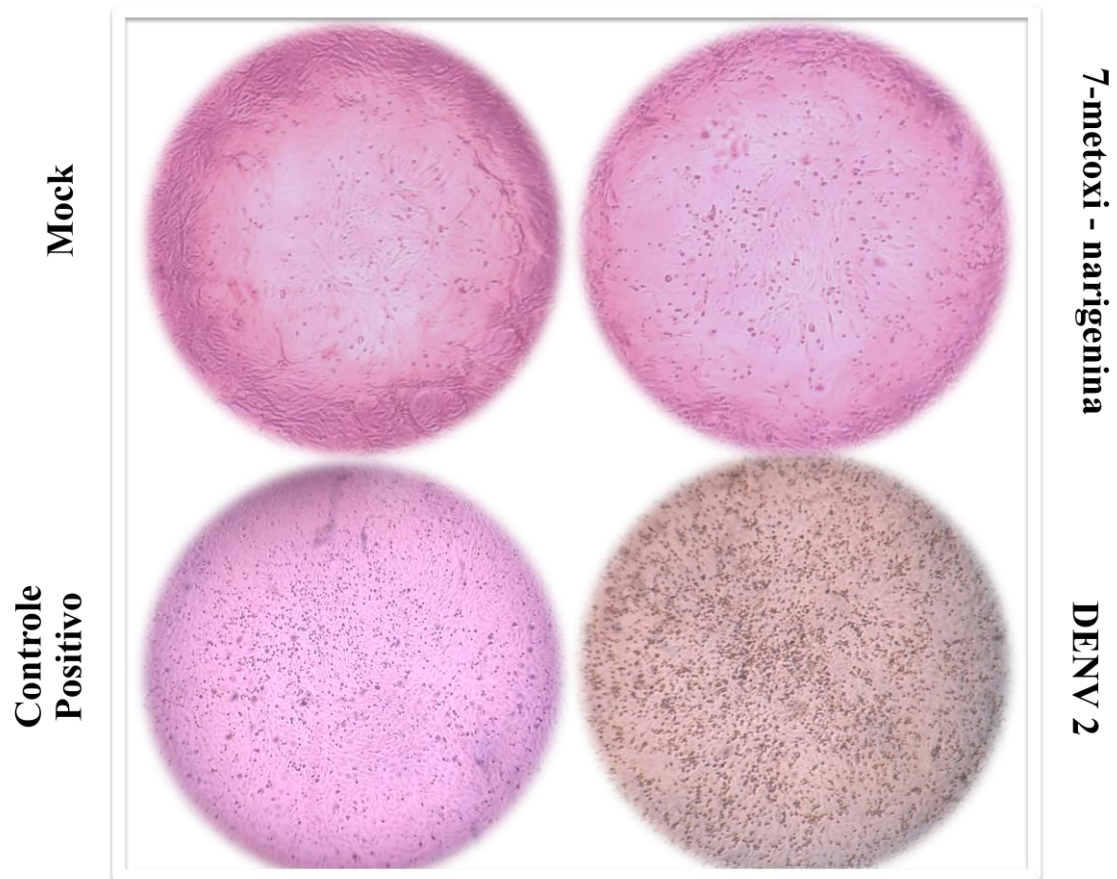


Fonte: A autora

Nota: Linhagem decélulas Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com DENV-2 por 2 horas. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada composto (6MMPr: 60,5  $\mu$ M; Narigenina: 86,43  $\mu$ g/ $\mu$ L.) e incubadas por 120 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMPr.



**Figura 21** - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o flavonóide 7-metoxi -narigenina

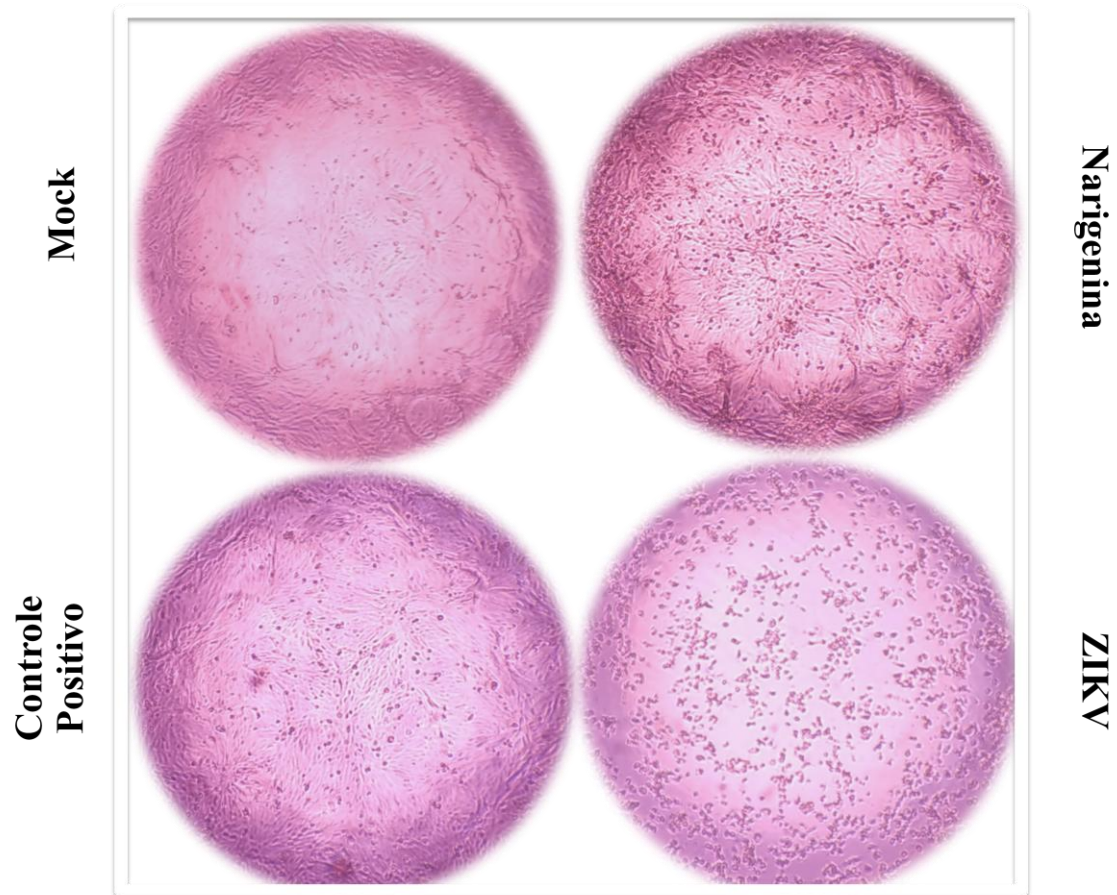


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com DENV-2 por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada composto (6MMP: 60,5  $\mu$ M; 7-metoxi-narigenina:105,2  $\mu$ M) e incubadas por 120 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMP.

Após a infecção com o ZIKV e o subsequente tratamento com as substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina, isoladas da geoprópolis, a monocamada de células apresenta-se relativamente saudável, porém a quantidade de células mortas ou com morfologia alterada, o que define a presença de efeito citopático é significativo quando comparado ao controle Mock e aos outros testes feitos quando os mesmos compostos foram desafiados contra o DENV-2 (Figura 22 e 23).

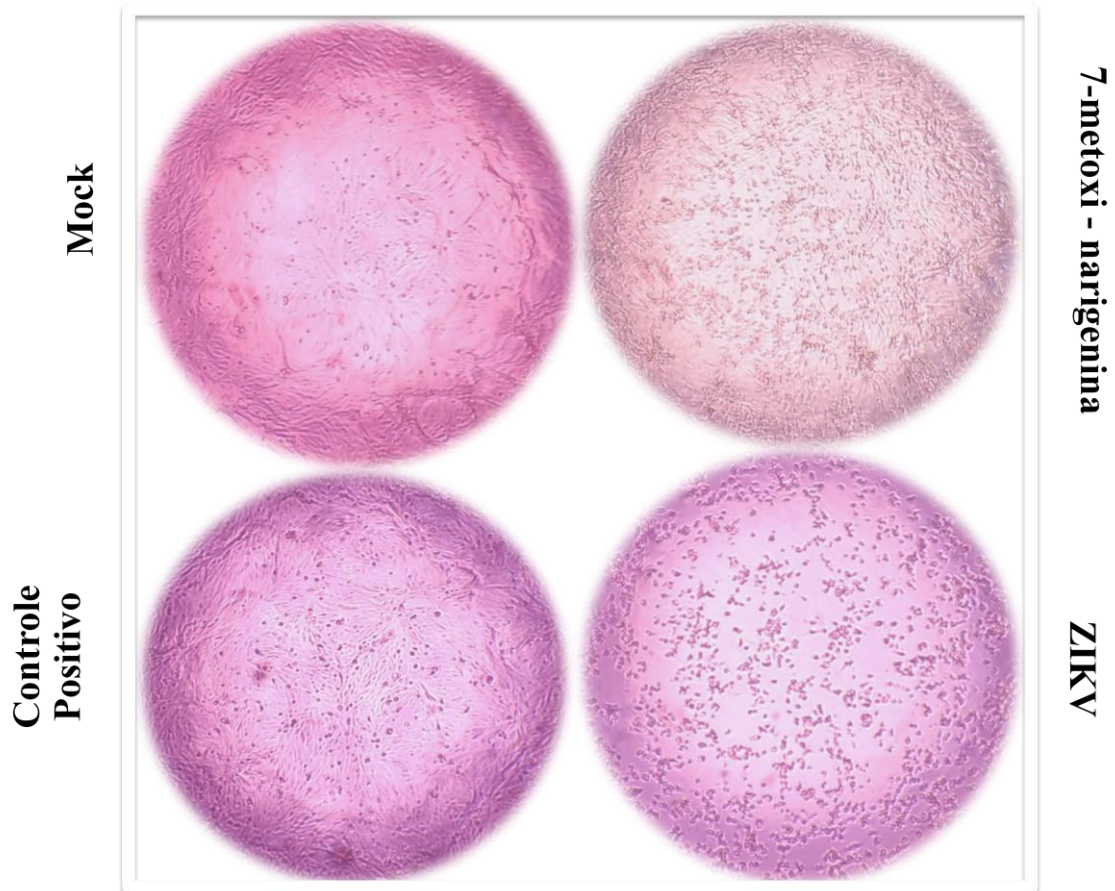
**Figura 22** - Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após tratamento com o flavonóide narigenina



Fonte: A autora

Nota: Linhagem decélulas Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com ZIKV por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada composto (6MMPr: 60,5  $\mu$ M e 7-metoxinarigenina: 105,2  $\mu$ M) e incubadas por 120 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMPr.

**Figura 23** - Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após tratamento com o flavonóide 7-metoxi - narigenina.



Fonte: A autora

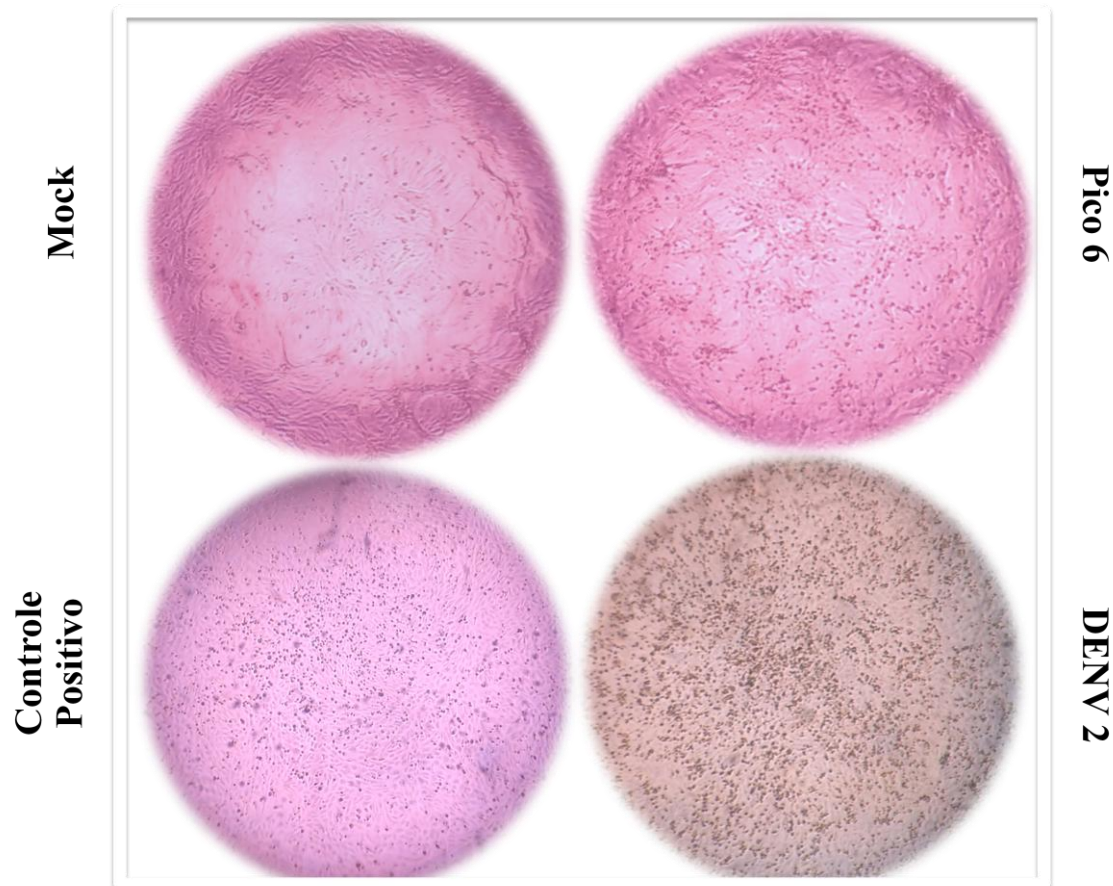
Nota: Linhagens de células Vero foram infectadas com a MOI de 0,1 com ZIKV por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada composto (6MMPr: 60,5  $\mu$ M e Narigenina 86,43  $\mu$ M) e incubadas por 120 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMPr.

O pico 6 apesar de ainda não ter sido identificado, devido a falta de análises espectroscópicas, recebe destaque neste trabalho, pois apresentou uma redução de efeito citopático apreciável contra o DENV-2 quando comparado com outros picos isolados da milona (Figura 24). Os poços infectados com o DENV-2 e posteriormente tratados com o pico 6 e o acaloide isolado da milona warifteína também apresentaram tapete celular conservado (Figura 25). Nas representações seguintes algumas células mortas são observadas porém a morfologia das células, ainda aderidas ao plástico, não apresenta alterações muito significativas. O sobrenadante dos poços que receberam tratamento também não apresenta diferenças significativas de coloração, sugerindo um baixo consumo de nutrientes e, portanto,



um nível metabólico reduzido (Figura 24 e 25).

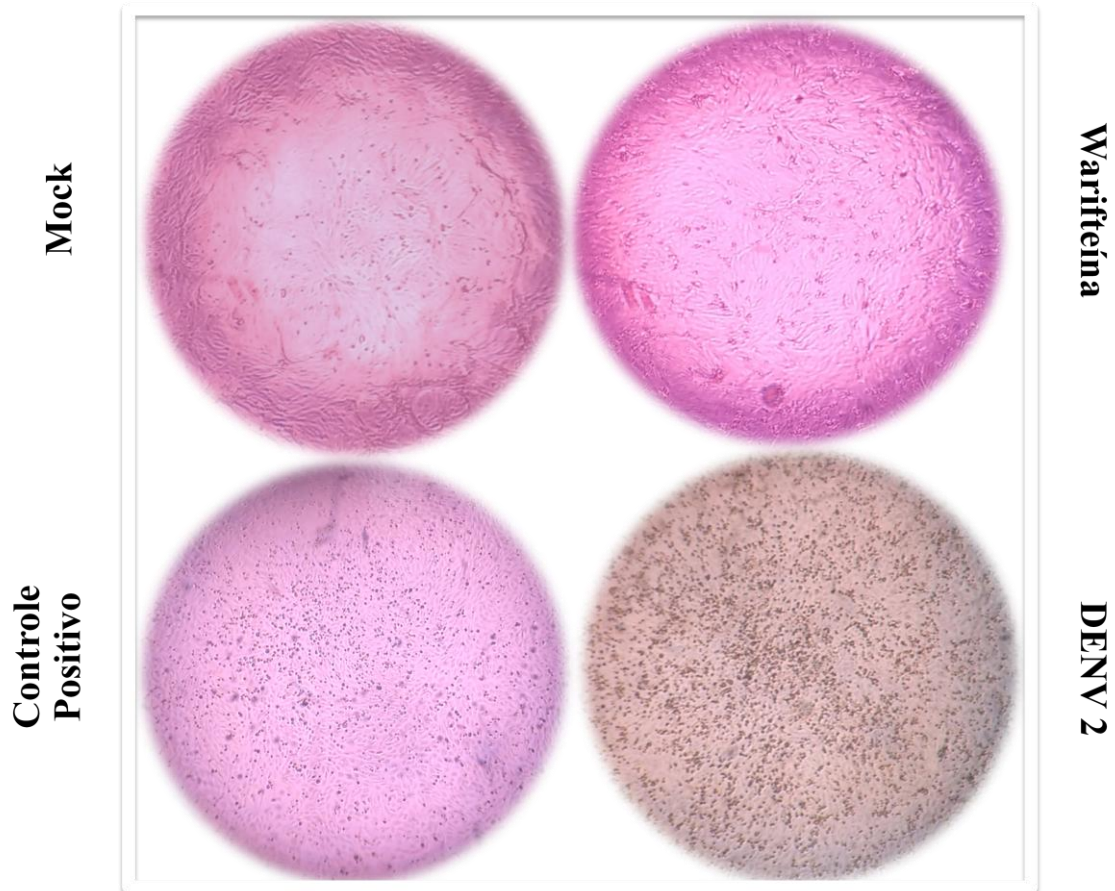
**Figura 24** - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o pico 6, isolado da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem decélulas Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com DENV-2 por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM e Pico 6: 7,894 µg.) e incubadas por 120 horas. . O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMPr.

**Figura 25** - Redução do efeito citopático característico do vírus DENV-2 após tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona

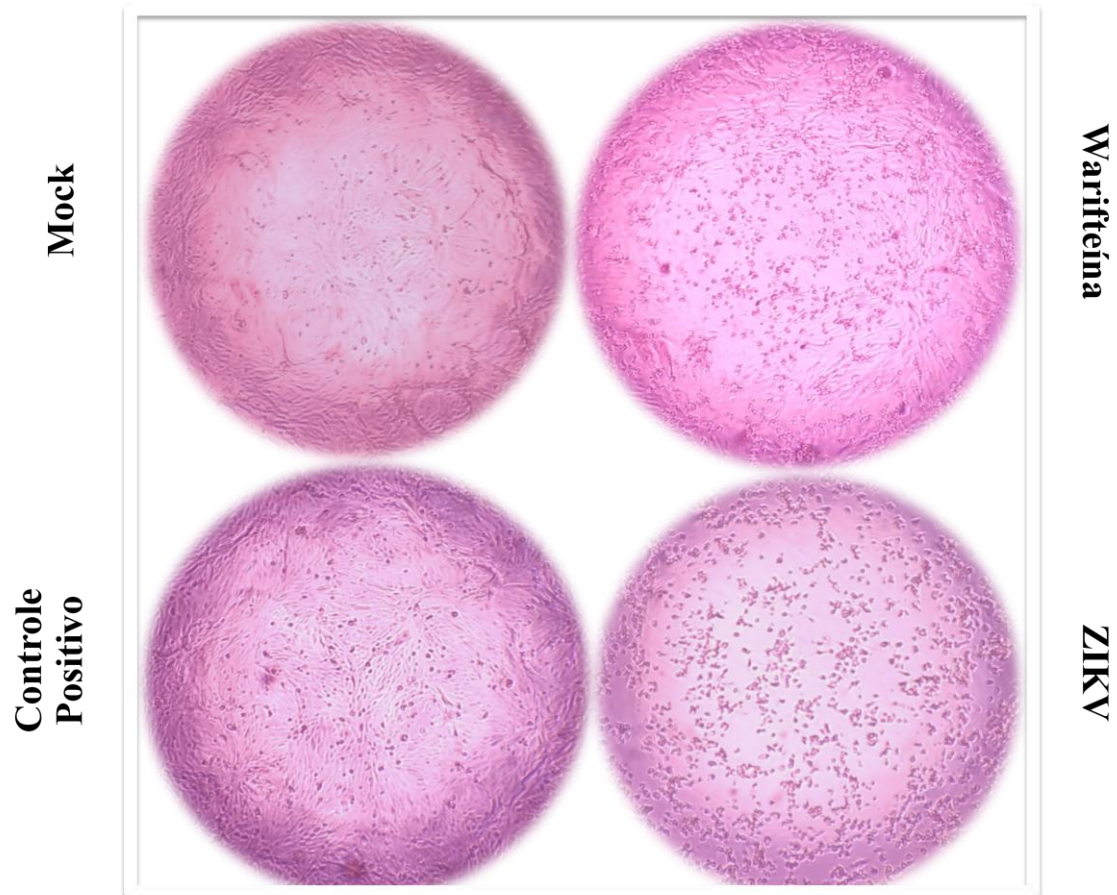


Fonte: A autora

Nota: Linhagem decélulas Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com DENV-2 por 1 hora. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada composto (6MMPr: 60,5  $\mu$ M; Warifteína: 10,49  $\mu$ M.) e incubadas por 120 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMPr.

Os poços infectados com o ZIKV e posteriormente tratados com o alcaloide isolado da milona warifteína também apresentaram tapete celular conservado. Entretanto, células mortas são observadas e a morfologia das células, ainda aderidas ao plástico, apresenta alterações significativas (Figura 26).

**Figura 26** - Redução do efeito citopático característico do vírus ZIKV após tratamento com o alcaloide warifiteína, isolado da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem decélulas Vero foi infectada com a MOI de 0,1 com ZIKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada composto (6MMPr: 60,5  $\mu$ M; Warifiteína: 10,49  $\mu$ M.) e incubadas por 120 horas. O controle mock corresponde a células cultivadas apenas com o meio DMEM. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMPr.

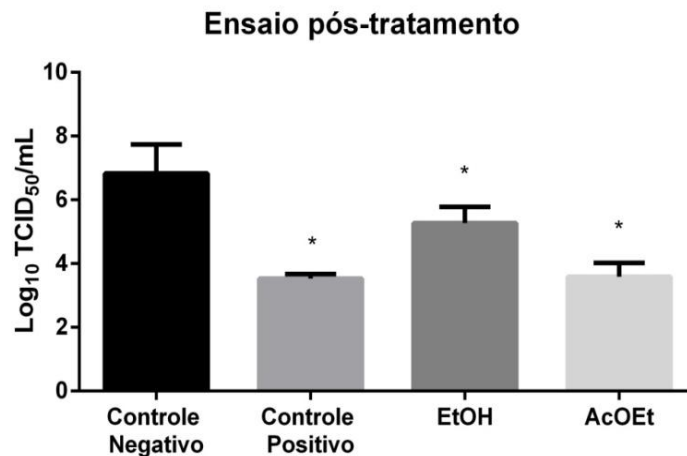
### 7.3 ATIVIDADE ANTIVIRAL

Todos os compostos derivados da geoprópolis e da milona demonstraram resposta antiviral para o vírus da dengue 2 e para o vírus Zika.

### 7.3.1 Derivados da geoprólis frente aos vírus dengue e Zika.

O Extrato Etanólico (EtOH), a fração Acetato de Etila (AcOEt) e os flavonóides isolados Narigenina e 7-metoxi-narigenina apresentaram resposta antiviral para os vírus da DENV-2 (Figuras 27 e 28).

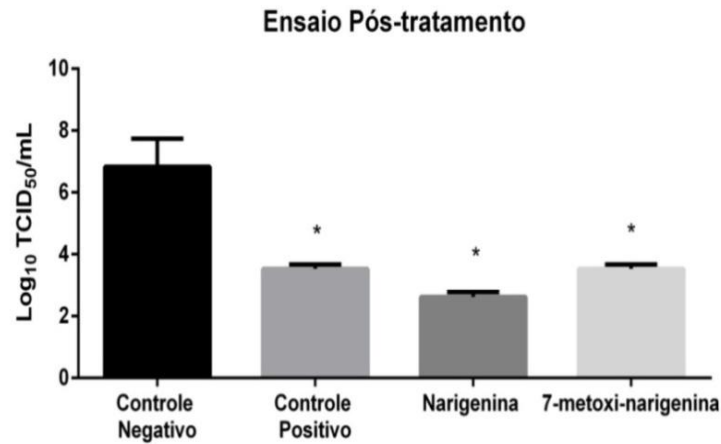
**Figura 27** - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com Extrato Etanólico (EtOH) e fração Acetato de Etila (AcOEt).



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV-2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMP: 60,5 µM; EtOH: 0,641 µg/µL; AcOEt: 0,293µg/µl) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMP. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

**Figura 28** - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com as substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina isoladas da geoprópolis



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV-2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM; Narigenina 86,43 µM e 7-metoxi-narigenina: 105,2µM) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05**Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.

Dentre os compostos derivados da geoprópolis, a redução do título viral observada foi significativa numérica e estatisticamente, tanto para o vírus da dengue 2 (Tabela 3).



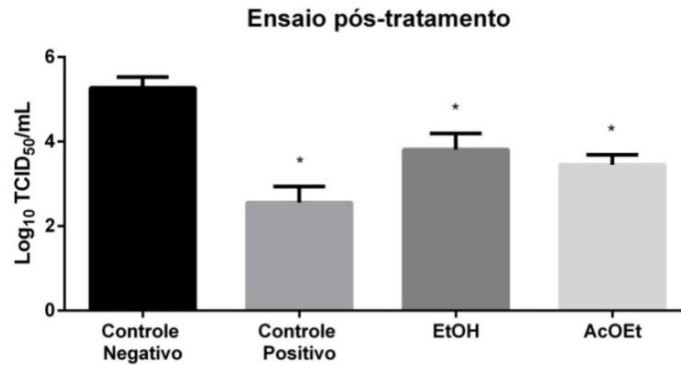
**Tabela 3** - Estimativa do IC<sub>50</sub> e IS de substâncias isoladas da geoprópolis em células Vero contra o DENV-2

Composto	Citotoxicidade	Atividade Antiviral			
		CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IS	Valor de redução do log <sub>10</sub>
				CC <sub>20</sub>	TCID <sub>50</sub>
Fração EtOH	2,47 µg	-	-	0,641 µg	1,55
Fração AcOEt	2,29 µg	-	-	0,293 µg	3,23
Fração Hexânica	10,30 µg	-	-	18,76 µg	-
Flavonóide Narigenina	241,6 µM	42,91 µM	5,6	86,43 µM	4,20
Flavonóide 7-metoxi-narigenina	240,4 µM	30,95 µM	7,7	105,2 µM	3,30
6MMPr (Controle Positivo)	291 µM	18,15 µM	16,0	60,5 µM	3,30

Fonte: A autora

O Extrato Etanólico (EtOH), a fração Acetato de Etila (AcOEt) e os flavonóides isolados Narigenina e 7-metoxi-narigenina apresentaram resposta antiviral para o ZIKV (Figuras 29 e 30).

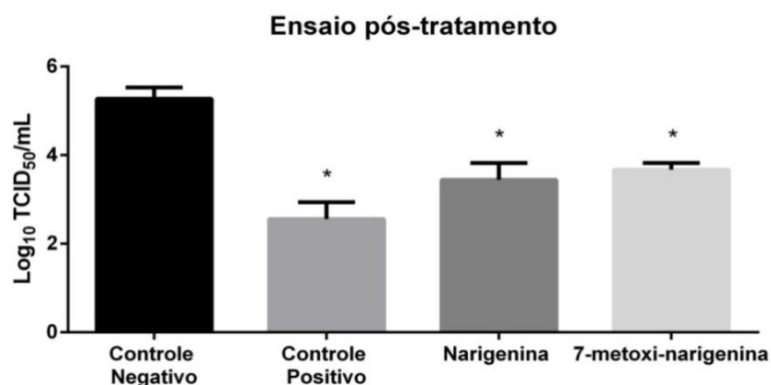
**Figura 29** - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com Extrato Etanólico (EtOH) e fração Acetato de Etila (AcOEt).



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZIKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMP: 60,5 µM; EtOH: 0,641 µg/µL; AcOEt: 0,293µg/µl) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMP. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05 Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

**Figura 30** - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com as substâncias narigenina e 7-metoxi-narigenina isoladas da geoprópolis.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZIKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMP: 60,5 µM; Narigenina 86,43 µM e 7-metoxi-narigenina: 105,2µM) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMP. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05 Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

Dentre os compostos derivados da geoprópolis, a redução do título viral observada foi significativa numérica e estatisticamente, tanto para o vírus Zika (Tabela 4).

**Tabela 4** - Estimativa do IC<sub>50</sub> e IS de substâncias isoladas da geoprópolis em células Vero contra o ZIKV.

Composto	Citotoxicidade		Atividade Antiviral		Valor de redução do log <sub>10</sub>	
	CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IS	CC <sub>20</sub>	TCID <sub>50</sub>	
Fração EtOH	2,47 µg	-	-	0,641 µg	1,29	
Fração AcOEt	2,29 µg	-	-	0,293 µg	1,65	
Fração Hexânica	10,30 µg	-	-	18,76 µg	-	
Flavonóide Narigenina	241,6 µM	58,89 µM	4,1	86,43 µM	1,66	
Flavonóide 7-metoxi-narigenina	240,4 µM	12,80 µM	18,7	105,2 µM	1,43	
6MMPr (Controle Positivo)	291 µM	24,5 µM	11,9	60,5 µM	2,55	

Fonte: A autora

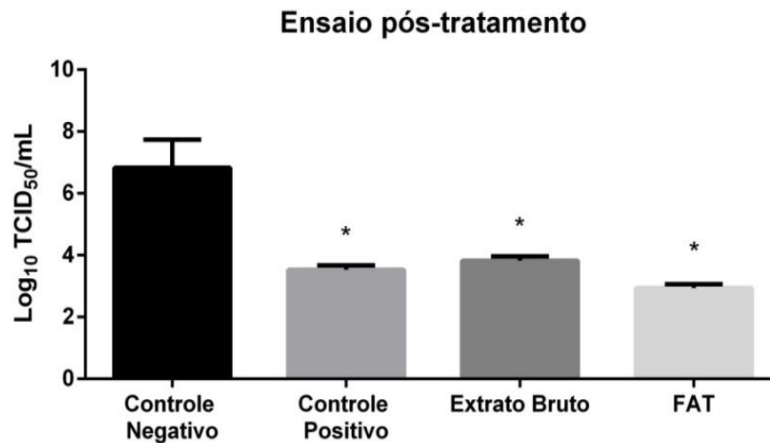
As tabelas 3 e 4 demonstram os valores de IC<sub>50</sub> e o IS dos flavonóides isolados da geoprópolis, testados neste estudo, frente ao DENV e ZIKV. Alme disso o valor corresponde ao Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> auxilia na comparação da capacidade de redução de título viral de cada composto.

O índice de seletividade das substâncias Narigenina, 7-metoxi-narigenina indicam a concentração mínima ideal para realização dos testes antivirais. Esta concentração garante pelo menos 50% da inibição viral sem comprometer mais de 50% da viabilidade celular.

### 7.3.2 Derivados da planta milona frente aos vírus dengue e Zika.

O Extrato Bruto, a Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT), os picos 1-6 apresentam atividade contra o DENV-2 (Figuras 31 e 32).

**Figura 31** - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com os compostos isolados da milona: Extrato Bruto, Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT).

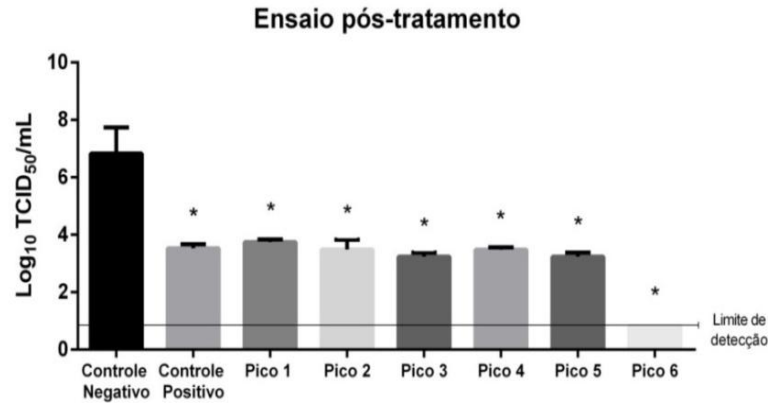


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV-2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMP: 60,5 µM; Extrato bruto: 5,730 µg e FAT: 9,820 µg) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMP. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

Dentre estes compostos é importante destacar o pico 6, o qual apresentou dentre os outros picos, considerável resposta antiviral para o vírus da dengue 2 (Figura 32 e 33).

**Figura 32** - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com os picos 1-6 isolados da milona.

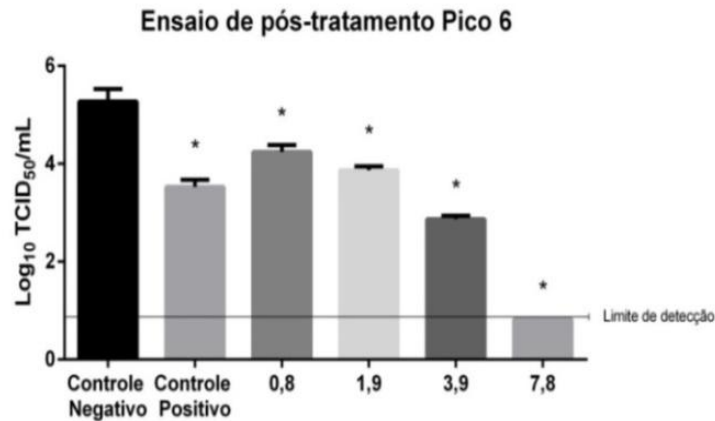


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV-2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM; Pico 1: 5,730 µg e Pico 2: 9,820 µg; Pico 3: 9,580 µg; Pico 4: 2,865 µg; Pico 5: 18,11 µg; Pico 6: 7,894 µg.) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV 2 e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV 2 e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

Considerando que a atividade antiviral decorrente da ação do pico 6 apresentou valor menor do que ~ 0,824, ou seja, o limite de detecção da técnica de TCID<sub>50</sub> (REED; MUENCH; 1938); fez-se necessário a avaliação de um limiar decrescente de concentrações a partir do CC<sub>20</sub>, para que o IC<sub>50</sub> pudesse ser então avaliado (Figura 33). Indicando assim a concentração correspondente a 50% de inibição viral (Tabela 5).

**Figura 33** - Análise do título viral do DENV-2 após o tratamento com diferentes concentrações do pico 6 isolado da milona.

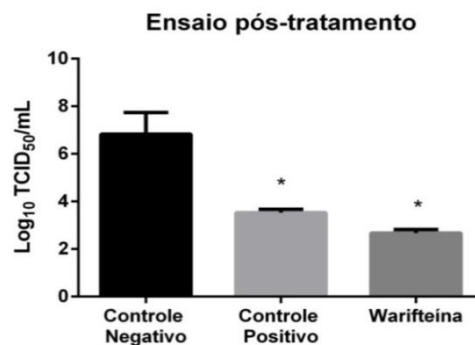


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV-2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> do 6MMPr: 60,5 µM; CC<sub>20</sub>: 7,8 µg; 1/2: 3,9 µg; 1/4: 1,9 µg e 1/8: 0,8 µg do pico 6 por 120 horas. O DENV-2 corresponde ao controle negativo enquanto que o 6MMPr corresponde ao controle positivo. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> (Limite de detecção: 0,824 TCID<sub>50</sub>) e réplicas biológicas. \***p<0,05 Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

O alcaloide isolado warifteína apresenta resposta antiviral para o vírus da Dengue 2 (Figura 34).

**Figura 34** - Análise da redução do título viral do DENV-2 após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do DENV-2 por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM e Warifteína: 10,49 µM) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com DENV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com DENV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

Dentre os compostos isolados da milona, a redução do título viral observada foi significativa numérica e estatisticamente, tanto para o DENV-2 (Tabelas 5).

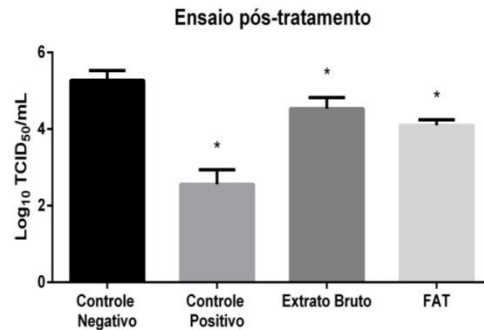
**Tabela 5** - Estimativa do IC<sub>50</sub> e IS de substâncias isoladas da milona em células Vero contra o DENV-2.

Composto	Citotoxicidade	Atividade Antiviral		Valor de redução do log <sub>10</sub>	
		CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IS	CC <sub>20</sub>
Extrato bruto	13,35 µg	-	-	5,730 µg	3,00
FAT	24,58 µg	-	-	9,820 µg	3,88
Pico 1	19,72 µg	-	-	7,125 µg	3,10
Pico 2	14,10 µg	-	-	5,244 µg	3,33
Pico 3	23,24 µg	-	-	9,580 µg	3,59
Pico 4	14,77 µg	-	-	2,865 µg	3,35
Pico 5	44,73 µg	-	-	18,11 µg	3,59
Pico 6	21,49 µg	2,0 µg	10,74	7,894 µg	6,00
Warifteína	150,3 µM	1,3 µM	115,6	10,49 µM	4,15
6MMPr (Controle Positivo)	291 µM	24,5 µM	11,9	60,5 µM	3,30

Fonte: A autora

Em relação ao vírus Zika, o extrato bruto; a Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT) apresentaram atividade antiviral (Figuras 35).

**Figura 35** - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com os compostos isolados da milona: Extrato bruto, Fração de Alcaloides terciários Totais (FAT).

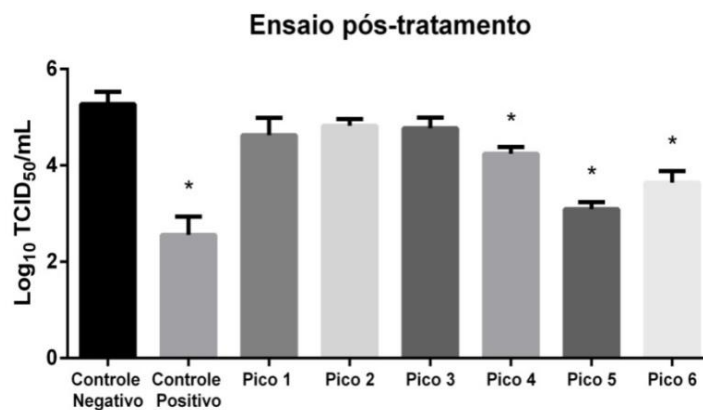


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZIKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM; Extrato bruto: 5,730 µg e FAT: 9,820 µg) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \*p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.

Os picos 4-6 e o alcaloide isolado warifteína, também apresentaram atividade antiviral contra o ZIKV. (Figuras 36 e 37).

**Figura 36** - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com os picos 1-6 isolados da milona.

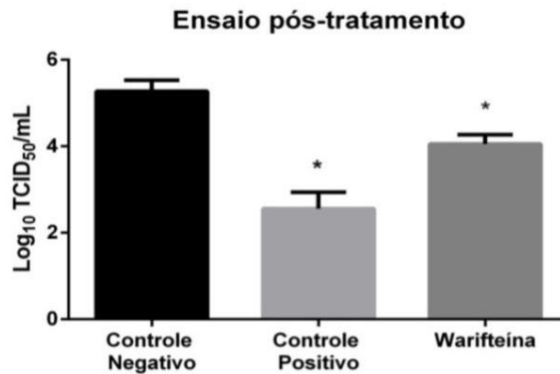


Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZIKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM; Pico 1: 5,730 µg e Pico 2: 9,820 µg; Pico 3: 9,580 µg; Pico 4: 2,865 µg; Pico 5: 18,11 µg; Pico 6: 7,894 µg.) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \*p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.



**Figura 37** - Análise da redução do título viral do ZIKV após o tratamento com o alcaloide warifteína, isolado da milona.



Fonte: A autora

Nota: Linhagem de células Vero foi infectada com a MOI de 0,1 do ZIKV por 1 hora. Em seguida, a monocamada de células foi tratada com concentrações correspondentes ao CC<sub>20</sub> de cada composto (6MMPr: 60,5 µM e Warifteína: 10,49 µM) e incubadas por 120 horas, e então o sobrenadante foi coletado e titulado por TCID<sub>50</sub>. O controle negativo corresponde a células infectadas com ZIKV e não tratadas, enquanto que o controle positivo corresponde a células infectadas com ZIKV e tratadas com o 6MMPr. Os resultados mostrados são a média ± desvio padrão do título viral em TCID<sub>50</sub> de réplicas biológicas. \***p<0,05. Anova unidirecional seguido do teste Dunnett.**

Dentre os compostos isolados da milona, a redução do título viral observada foi significativa numérica e estatisticamente, para o ZIKV (Tabela 6).

**Tabela 6** - Estimativa do IC<sub>50</sub> e IS de substâncias isoladas da milona em células Vero contra o ZIKV.

Composto	Citotoxicidade	Atividade Antiviral			
		CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	IS	Valor de redução do log <sub>10</sub> CC <sub>20</sub> TCID <sub>50</sub>
Extrato bruto	13,35 µg	-	-	5,730 µg	0,57
FAT	24,58 µg	-	-	9,820 µg	1,00
Pico 1	19,72 µg	-	-	7,125 µg	0,48
Pico 2	14,10 µg	-	-	5,244 µg	0,28
Pico 3	23,24 µg	-	-	9,580 µg	0,33
Pico 4	14,77 µg	-	-	2,865 µg	0,86
Pico 5	44,73 µg	-	-	18,11 µg	2,01
Pico 6	21,49 µg	-	-	7,894 µg	1,46
Warifteína	150,3 µM	2,2 µM	68,3	10,49 µM	1,05
6MMPr (Controle Positivo)	291 µM	24,5 µM	11,9	60,5 µM	2,55

Fonte: A autora

A tabela 6 demonstra os valores de IC<sub>50</sub> e o IS de cada acoide isolado da milona, para cada um dos flavivírus avaliados. Adicionalmente o valor corresponde ao Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> auxilia na comparação da capacidade de redução de título viral de cada composto.

O índice de seletividade da warifteína é a concentração mínima ideal para realização dos testes antivirais, a qual garante pelo menos 50% da inibição viral sem comprometer mais de 50% da viabilidade celular. O valor de IS corresponde a uma razão usada para comparação entre compostos em fase de testes e compostos com eficiência já comprovada.

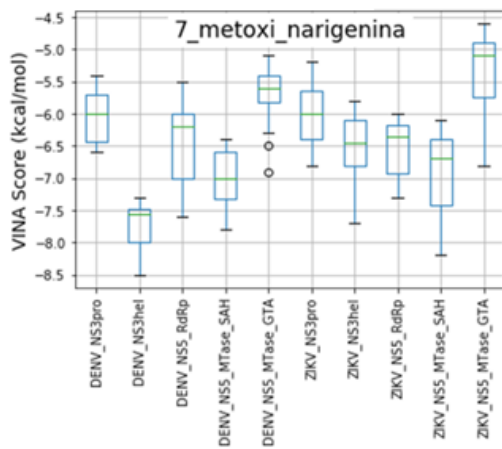
#### 7.4. DOCKING MOLECULAR

Os ensaios de *docking* molecular, realizados pelo Dr. Gustavo Seabra (UFPE) descrevem a interação entre as moléculas isoladas da geoprópolis e da milona e as principais proteínas dos *Flavivirus*. Os valores expressos no VINA *score* (kcal/mol) mostram o quanto à interação entre a molécula e as proteínas virais ocorre de forma mais (valores negativos) ou

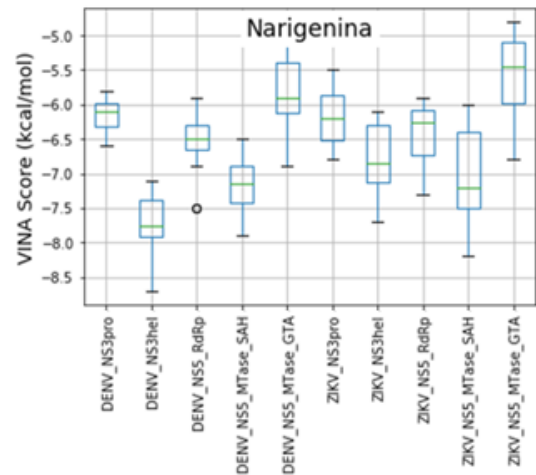
menos (valores positivos) espontânea. Estes resultados ajudam a esclarecer quanto as principais proteínas virais e seus domínios (NS3pro–protease e NS3hel – helicase; NS5MTase e NS5RdRp) são afetadas pela ação de cada um dos compostos.

**Figura 38** - *Docking* molecular 7-metoxi-narigenina e narigenina.

**A**



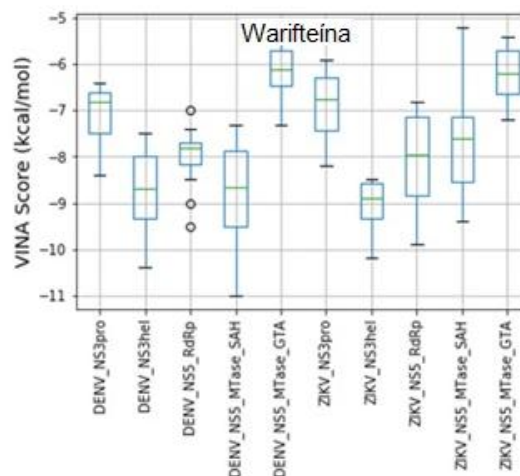
**B**



Fonte A autora

Nota: Interação entre os sítios de ligação das moléculas narigenina (A) e 7-metoxi-narigenina (B), isoladas a partir da geoprólise as diferentes proteínas do vírus da dengue e vírus Zika.

**Figura 39** - *Docking* molecular warifteína.



Fonte: A autora

Nota: Interação entre os sítios de ligação da molécula warifteína, isolada a partir da milona, e as diferentes proteínas do vírus da dengue e vírus Zika.

Sugere-se que a narigenina apresenta uma boa afinidade à NS3 helicase do DENV, e a NS5 MTase do ZIKV. A 7-metoxi-narigenina indica um aumento na afinidade com todas as proteínas de ambos os vírus. E por fim a warifteína, que apresenta resultados muito semelhantes entre si, porém é possível admitir uma interação maior com a NS3 helicase do ZIKV.

## 8 DISCUSSÃO

Os dados obtidos no teste de citotoxicidade servem como base para orientar as decisões futuras dentro da pesquisa com antivirais. Estes dados asseguram que as concentrações de cada composto a ser desafiado com o agente patogênico são seguras para indivíduo que receberá o tratamento com a droga em questão. Os valores correspondentes ao  $CC_{20}$  de cada extrato, substância e fração utilizada neste trabalho foram obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade em células da linhagem Vero. Estes resultados permitiram e direcionaram os testes antivirais posteriores. A fração hexânica, isolada a partir da geoprópolis, apresentou alta toxicidade, e foi excluída dos testes seguintes. Esta característica ofensiva para as células é por outro lado benéfica quando se trata de linhagens celulares cancerígenas, como por exemplo, células HeLa e MCF-7 (ALEXANDER *et al.*, 2019; AMNA *et al.*, 2019). O flavonóide narigenina e o 7-metoxi-narigenina isolados a partir da geoprópolis apresentou baixa citotoxicidade, resultado semelhante ao que é previamente descrito na literatura para a narigenina  $CC_{50} = 230.3 \pm 0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $CC_{50} = 250 \mu\text{M}$  (FRABASILE *et al.*, 2017; SALEHI *et al.*, 2019; ZANDI *et al.*, 2011;), reforçando, portanto o já conhecido perfil de competente candidato antiviral. O acoide waraftína também apresentou citotoxicidade satisfatória, assim como em outros estudos envolvendo linhagens celulares distintas (MELO *et al.*, 2003) e modelo animal (LIMA *et al.*, 2014). Em relação aos demais extratos, frações e substâncias derivadas da geoprópolis e da milona todos apresentaram citotoxicidade aceitável para a linhagem de células Vero o que propiciou o progresso dos experimentos subsequentes.

A primeira etapa do teste antiviral, o ensaio de *screening* possibilitou uma seleção prévia dos compostos que indicavam uma capacidade terapêutica a ser considerada. Bennett *et al.* (2014) esclarece que ensaios laboratoriais para testes de susceptibilidade antiviral buscam avaliar uma série de concentrações decrescentes, a partir da concentração equivalente ao  $CC_{20}$ , permitindo conhecer qual a concentração compatível com a capacidade mínima de ação antiviral de cada composto. Através da observação do efeito citopático, definida por Bennett *et al.* (2014) como uma análise fenotípica, em comparação com o controle mock, foi possível compreender quais extratos, frações e substâncias isoladas tanto da geoprópolis quanto da milona apresentaram redução significativa da ação viral. O conhecimento prévio da

estrutura e identificação das substâncias 7-metoxi-narigenina e narigenina; a qual possui atividade antiviral já demonstrada por Frabasile *et al.* (2017); Salehi *et al.* (2019); Zandi *et al.* (2011); e da warifteína; isolada da milona; permitem um entendimento mais concreto das possíveis interações e mecanismos de ação de cada uma destas substâncias com as estruturas celulares ou com as proteínas virais. O pico 6, um dos componentes majoritários da FAT de milona, apesar de ainda não possuir identidade molecular definida, recebeu destaque no ensaio de *screening* por apresentar relevante redução do efeito citopático causado pelo DENV-2. A purificação, isolamento e por fim identificação deste componente significa a descoberta de um potente candidato antiviral para o vírus dengue.

Na segunda parte dos testes antivirais, o ensaio de titulação viral, foi realizado fim de obter uma quantificação das partículas virais após o tratamento com o extrato, frações e substâncias isoladas da geoprópolis e com o extrato, fração, picos e substância isolada da milona. Usamos como controle positivo, uma droga de ação já validada o 6mmpR (CARVALHO *et al.*, 2016), e como controle negativo, os vírus dengue ou Zika. Por fim foi possível, através do teste *t* –*student* e ANOVA (GraphPadPrism 5.0.) realizar análises estatísticas e numéricas, e afirmar que a maior parte dos compostos testados, derivados tanto da geoprópolis quanto da milona, apresentam uma redução de título viral significativa tanto para o DENV-2 quanto para o ZIKV. Corroborando assim com as conclusões obtidas a partir da redução de efeito citopático observado no teste de *screening* realizado previamente. Frabasile *et al.* (2019) e Zandi, *et al.* (2019) já haviam comprovado a atividade antiviral do flavonóide narigenina, indicando assim que a variação desta molécula, a 7-metoxi-narigenina também tem potencial antiviral. Considerando o potencial terapêutico, o acoide warafteína, já apresenta atividade antiparasitária (SILVA, E *et al.*, 2012) e imunomoduladora que contribuem para o entendimento da atividade antiviral descrita no presente trabalho. Ainda na etapa de testes antivirais, além da quantificação de partículas virais diante da ação do CC<sub>20</sub>; o limite de ação de cada composto também pôde ser identificado. Permitindo assim a identificação do IS, o valor atribuído a esta razão assim como os valores atribuídos ao título viral (Log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>); são usados para interpretar a relevância dos compostos testados neste trabalho diante de outras drogas já aprovadas e comercializadas como o 6MMPr e outros.

Os testes de docking molecular realizados pelo Dr. Gustavo Seabra (UFPE), auxiliam na compreensão da interação entre a estrutura molecular de cada substância com as principais

proteínas do vírus e seus respectivos domínios (NS2b-NS3pro, NS2bNS3hel, NS5Mtase, NS5RdRp). Lima e Seabra,(2016) descrevem que o DENV utiliza a serina protease NS2bNS3pro, para clivar a poliproteína viral em seus constituintes, destacando esta proteína como um importante alvo antiviral. Em relação ao ZIKV, Elfik e Ismail, (2018) relatam, que através da ancoragem molecular usando, o AutoDock Vina foi possível rastrear 16 inibidores de nucleotídeos contra o ZIKV NS5RdRp. Sahoo *et al.* (2016), através de um estudo de *screening* usando o programa AutoDock Vina, identificou potenciais inibidores da proteína NS3 do ZIKV. Todos os estudos citados reforçam a percepção de que estas proteínas virais servem como potentes alvos antivirais, para a ação dos compostos aqui testados.

Todos os valores obtidos no VINA *score* (kcal/mol) são negativos propiciando inferir que o atracamento entre as moléculas testadas e as proteínas virais ocorre de forma espontânea. Os inibidores nucleotídicos descritos por Elfik e Ismail, (2016) apresentam, valores de 6,2 a -9,7 kcal / mol (AutoDockVina) indicando afinidades de ligação promissoras para ZIKV NS5RdRp.

Entretanto os resultados gerados a partir do *docking* molecular apenas não são capazes de diferenciar de forma mais clara os sítios de ligação de cada uma das moléculas testadas. Ensaio futuros baseados no comportamento das proteínas virais após o tratamento com a narigenina, 7-metoxi-narigenina e warifetína irão auxiliar no esclarecimento do mecanismo de ação dos compostos testados.

Em relação aos extratos, frações e picos, isolados da geoprópolis e da milona, os dados obtidos até o momento permitem selecionar, os que demonstraram expressiva resposta terapêutica e dar continuidade aos testes antivirais em diferentes tempos da infecção contra os diferentes sorotipos de DENV e contra o ZIKV *in vitro* e *in vivo*. Indicando, portanto, quais os componentes, tanto da geoprópolis e milona merecem maior prioridade de isolamento para obtenção de novas substâncias derivadas. As informações aqui apresentadas são de extrema importância, portanto, para delimitar o trabalho dos grupos de pesquisa colaboradores.

## 9 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou a atividade antiviral do extrato, fração e substâncias derivadas da geoprópolis; além do extrato, a fração, os picos e a substância derivados da milona contra vírus de extrema importância clínica.

O extrato, frações; com exceção da hexanica; e substâncias derivadas da geoprópolis; além do extrato, a fração, os picos e a substância derivados da milona não apresentaram ou apresentaram uma taxa de citotoxicidade aceitável para a linhagem de células Vero.

Todos os compostos testados da geoprópolis apresentaram redução significativa do título viral frente ao sorotipo DENV 2 e ao ZIKV, apresentando, portanto, potencial de inibição da infecção *in vitro*.

No caso da planta milona, foi observado em todos os compostos testados a redução significativa do título viral frente ao sorotipo DENV-2. Para o vírus Zika, com exceção dos picos 1, 2, e 3; todos os outros compostos testados também apresentaram redução significativa do título viral.

A capacidade de inibição foi observada durante o ensaio de pós-tratamento, o que nos permite concluir que os extratos e frações e substâncias isoladas tanto da geoprópolis quanto da milona possivelmente atuam em alguma das etapas da replicação viral.



## **10 PESPECTIVAS FUTURAS**

Outros testes necessitam ser executados para esclarecer o mecanismo de ação específico de cada um dos compostos isolados aqui testados. Os testes futuros serão fundamentados pelos resultados obtidos até o momento que corroboram com a hipótese de que as suas substâncias derivadas da geoprólise da milona apresentam atividade antiviral para o vírus da dengue 2 e para o vírus Zika.

## REFERÊNCIAS

- ABD KADIR, S. L. *et al.* Potential anti-dengue medicinal plants: A review. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 67, n. 4. p. 677 - 689, 2013.
- ACOSTA, E. G. *et al.* Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 1533 - 1549, 2009.
- ACOSTA, E. G. *et al.* Cell entry of dengue virus. **Future Virology**, London, v. 3, n. 5, p. 471 - 479, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **A Gerência de Farmacovigilância alerta para risco de reativação da hepatite B em pacientes que utilizam antivirais de ação direta para tratamento da hepatite C.** 2019. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/resultadodebusca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=3086667&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=33868&\\_101\\_urlTitle=risco-de-reativacao-da-hepatite-b-em-pacientes-em-tratamento-da-hepatite-c-com-dda&inheritRedirect=true](http://portal.anvisa.gov.br/resultadodebusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3086667&_101_type=content&_101_groupId=33868&_101_urlTitle=risco-de-reativacao-da-hepatite-b-em-pacientes-em-tratamento-da-hepatite-c-com-dda&inheritRedirect=true). Acesso em: 29 jul. 2019
- AGUMADU, V. C.; RAMPHUL, K. Zika Virus: a review of literature. **Cureus**, Palo Alto, v. 10, n. 7, p. 282-289, 2018.
- ALEXANDER, C. *et al.* Dinuclear platinum (II) complexes of imidazophenanthroline-based bridging ligands as potential anticancer agents: synthesis, characterization, and *in vitro* cytotoxicity studies. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, Berlim, v. 24, n. 6, p. 405 - 418, 2019.
- ALI, A. *et al.* Advances in research on Zika virus. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, Haikou, v. 10, n. 4, p. 321-331, 2017.
- ALVES, A. F. *et al.* Milonine, an alkaloid of *Cissampelos sympodialis* eichl. (Menispermaceae) inhibits histamine release of activated mast cells. **Inflammation**, New York, v. 40, n. 6, p. 2118 - 2128, 2017.
- AMNA, U. *et al.* Evaluation of cytotoxic activity from Temurui (*Murraya koenigii* [Linn.] Spreng) leaf extracts against HeLa cell line using MTT assay. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, Mumbai, v. 10, n. 2, p. 51-55, 2019.
- ARAGÃO, C. F. S. S. *et al.* Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, n.2, p. 60-61, 2002

- ASSELAH, T. *et al.* Deferred treatment with a fixed-dose combination of sofosbuvir-velpatasvir for chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 4, and 6 infection. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jvh.13159>. Acesso em 29 Jul. 2019.
- BABA, N.; AKAHO, E. VSDK: Virtual screening of small molecules using AutoDock Vina on Windows platform. **Bioinformatics**, Singapore, v. 6, n. 10, p. 387, 2011.
- BALASUBRAMANIAN, A. *et al.* Inhibition of dengue virus by curcuminoids. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 162, p. 71 - 78, 2019.
- BALMASEDA, A. *et al.* Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 74, n. 3, p. 449-456, 2006
- BARBA-SPAETH, G. *et al.* Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. **Nature**, London, v. 536, n. 7614, p. 48 - 53, 2016.
- BARBOSA-FILHO, J. *et al.* Alkaloids of the menispermaceae. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, San Diego, v. 54, p. 1 - 190, 2000.
- BARBOSA-FILHO, J. *et al.* Botanical, chemical and pharmacological investigation on *Cissampelos* species from Paraíba (Brazil). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 49, p. 386 – 394, 2015
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.**, São Paulo: EDUSP, 1978.
- BARROWS, N. J. *et al.* Biochemistry and molecular biology of *Flaviviruses*. **Chemical reviews**, Washington, v. 118, n. 8, p. 4448 - 4482, 2018.
- BATISTA, M. N. *et al.* Natural products isolated from oriental medicinal herbs inactivate Zika virus. **Viruses**, Basel, v. 11, n.1, p. 1 - 10, 2019.
- BENNETT, J. E. *et al.* **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** 8th ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2015.
- BEZERRA-SANTOS, C. R. *et al.* Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 6, n. 7, p. 1152 - 1160, 2006
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 504 - 507, 2013.
- BOLDESCU, V. *et al.* Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 16, n. 8, p. 565, 2017

BOTTING, C.; KUHN, R. J. Novel approaches to *Flavivirus* drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, London, v. 7, n. 5, p. 417 - 428, 2012.

BRADY, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001760>. Acesso em: 29 Jul. 2019.

BRAY, M. Highly pathogenic RNA viral infections: challenges for antiviral research. **Antiviral research**. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243346/>. Acesso em: 15 Jul. 2019.

BRECHER, M. *et al.* The *Flavivirus* protease as a target for drug discovery. **Virologica Sinica**, Beijin, v. 28, n. 6, p. 326 - 336. 2013

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 347 - 363, 1998.

CÁMARA, J. Q. *et al.* Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melípona subnitida* no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Natal, v. 4, n. 1 p. 1 - 20, 2004.

CARVALHO, O. V. *et al.* The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMP<sub>r</sub>) effectively blocks Zika virus replication. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 50, n. 6, p. 718 - 725, 2017.

CAVALCANTI, A. C. *et al.* Phamacognostic evaluation of *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaves. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 93, p. 70 - 78, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Microcefalia e outros defeitos congênitos**. Atlanta: CDC, 2018. Disponível em: [https://portugues.cdc.gov/Zika/healtheffects/birth\\_defects.html](https://portugues.cdc.gov/Zika/healtheffects/birth_defects.html). Acesso em: 29 Jul. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Zika vírus - Sintomas**. Atlanta: CDC, 2019. Disponível em: <https://portugues.cdc.gov/Zika/symptoms/symptoms.html>. Acesso em: 15 Jul. 2019.

CERQUEIRA-LIMA., *et al.* Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **Current drug targets**, Hilversum, v. 11, n. 11, p. 1458 - 1467, 2010.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Replication, organization and expression. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 44, p. 649 - 688, 1990.

CHANG, C. *et al.* The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 68, p. 1 - 13, 2016.

CLINICAL TRIALS. **Efficacy and safety of ivermectin against dengue infection**. 2015. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02045069>. Acesso em: 02 Ago. 2018

CLINICAL TRIALS. **Safety and tolerability of an antibody against Zika virus (tyzivumab) in humans**. 2018. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03443830term=drug&cond=Zika&rank=2>. Acesso em: 02 Ago. 2018.

COELHO, G. R. *et al.* Antiviral action of hydromethanolic extract of geopropolis from *scaptotrigona postica* against antih herpes simplex virus (HSV-1). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/296086/abs/>. Acesso em: 29 jul. 2019.

CÔRTEZ, F. S. *et al.* Spasmolytic actions of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the root bark of *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Phytotherapy Research**, London, v. 9, n. 8, p. 579 - 583, 1995.

COUDEVILLE, L. *et al.* Potential impact of dengue vaccination: Insights from two large-scale phase III trials with a tetravalent dengue vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 34, n. 50, p. 6426 - 6435, 2016.

CRUMP, A.; OMURA, S. Ivermectin, 'Wonder drug' from Japan: the human use perspective. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v. 87, n. 2, p. 13 - 28, 2011.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 115 - 133, 2004.

DE CLERCQ, E., LI, G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 29, n. 3, p. 695 - 747, 2016.

DICK, G. W. A.; HADDOW, A. J. Uganda S virus: A hitherto unrecorded virus isolated from mosquitoes in Uganda..(I). Isolation and pathogenicity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 6, p. 600-618, 1952.

ELFIKY, A. A.; ISMAIL, A. M. Molecular docking revealed the binding of nucleotide/side inhibitors to Zika viral polymerase solved structures. **SAR and QSAR in Environmental Research**, London, v. 29, n. 5, p. 409-418, 2018.

EL SAYED, K. A. Natural products as antiviral agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, Amsterdam, v. 24, p. 473-572, 2000.

EPIDEMIOLOGICO[DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 50, n. 13, abr. 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2019.

EPIMIOLOGICO [DA] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 49, n. 11, jul. 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/14/Informe-Arboviroses-SE-22.pdf>. Acesso em: 15 Jul. 2019.

ESPÍRITO SANTO. Secretaria de Saúde. **Mosquito – *Aedes aegypti***. 2019. Disponível em: <https://mosquito.saude.es.gov.br/aedes-aedypti>. Acesso em: 16 jul. 2019.

FARES, R. C. G. *et al.* Epidemiological scenario of dengue in Brazil. **BioMed research international**, New York, v. 2015, 2015. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/321873/abs/>. Acesso em: 22 de Jul. 2019.

FELIX, D. M. **Avaliação de produtos naturais e sintéticos contra o Herpes Simplex vírus 1**. 2014. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014

FERNANDEZ, E., DIAMOND, M. S. Vaccination strategies against Zika virus. **Current Opinion in Virology**. Amsterdam, v. 23, p. 59 - 67, 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Estados Unidos). **Guidance for industry antiviral product development. Conducting and submitting virology studies to the agency**. 2006. Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2006/06/05/E6-8635/guidance-for-industry-on-antiviral-product-development-conducting-and-submitting-virology-studies-to>. Acesso em: 01 Ago. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (Estados Unidos). **Influenza antiviral medications: summary for clinicians**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>. Acesso em: 29 Jul. 2019.

FRABASILE, S. *et al.* The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. **Scientific Reports**, London, v. 7, p.41864, 2017.

FRANCHIN, M. *et al.* Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 143, n. 2, p. 709 - 715, 2012.

FREITAS, M. R. *et al.* Milonine, an 8, 14-dihydromorphinandienone alkaloid from leaves of *Cissampelos sympodialis*. **Phytochemistry**, New York, v. 40, n. 5, p. 1553-1555, 1995.

- FREITAS, M. R. *et al.* Modification of Ca<sup>2+</sup> metabolism in the rabbit aorta as a mechanism of spasmolytic action of warifteine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 48, n. 3, p. 332 - 336, 1996.
- FURUTA, Y. *et al.* T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 82, n. 3, p. 95 - 102, 2009.
- GANE, E. J. *et al.* Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir plus Ribavirin for Hepatitis C. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 368, n. 1, p. 34 - 44, 2013.
- GARCÍA, L. L. *et al.* Inhibitors compounds of the *flavivirus* replication process. **Virology Journal**, London, v. 14, n. 1, p. 95, 2017.
- GOULD, E. *et al.* Emerging arboviruses: Why today?. **One Health**, Amsterdam, v. 4, p. 1 - 13, 2017.
- GUEDES, D. R. *et al.* Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. **Emerging Microbes & Infections**, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.
- GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews microbiology**, London. v. 8, n. 12, p. S7, 2010.
- HASAN, S. S. *et al.* Structural biology of Zika virus and other *flaviviruses*. **Nature structural & molecular biology**, New York, v. 25, n. 1, p. 13, 2018.
- HU, Y; SUN, L. Systematic Analysis of Structure Similarity between Zika Virus and Other *Flaviviruses*. **ACS infectious diseases**, Washington, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsinfecdis.9b00047>. Acesso em 29 Jul. 2019.
- HUCHTING, J. *et al.* Cell line-dependent activation and antiviral activity of T-1105, the non-fluorinated analogue of T-705 (favipiravir). **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 167, p. 1 - 5, 2019.
- HUDSON, J. B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton: CRC Press, 1990.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR MEDICAL ASSISTANCE TO TRAVELLERS. **Brazil general health risks: dengue outbreak**. 2019. Disponível em: <https://www.iamat.org/country/brazil/risk/dengue>. Acesso em: 22 Jul. 2019.
- JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 3, p. 412 - 427, 2003.
- JUSSIEU, A. L. **Genera Plantarum: secundum ordines naturales disposita juxta methodum in Horto Regio Parisiensi exaratam**. Paris: Viduam Herissant et Theophilum Barrois. Paris, 1789.



- KANG, H. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Stephania tetrandra* S. Moore on interleukin-6 production and experimental inflammatory disease models. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 5, n. 4, p. 280 - 291, 1996.
- KIM, J. A. *et al.* Favipiravir and ribavirin inhibit replication of Asian and African strains of Zika virus in different cell models. **Viruses**, Basel, v. 10, n. 2, p.72, 2018.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, London, v. 4, n. 3, p. 206, 2005.
- KRISHNAN, M. N. *et al.* Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, n. 9, p. 4881 - 4885, 2007.
- LIMA, M. C. P.; SEABRA, G. M. Reaction mechanism of the dengue virus serine protease: a QM/MM study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 18, n. 44, p. 30288 - 30296, 2016.
- LIMA, T. F. A. *et al.* Warifteine, an alkaloid purified from *Cissampelos sympodialis*, inhibits neutrophil migration *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2014, p.1 - 12, 2014.
- LI, L. *et al.* Structure-guided discovery of a novel non-peptide inhibitor of dengue virus NS2B-NS3 protease. **Chemical biology & drug design**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 255 - 264, 2015.
- LIN, L. T. *et al.* Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. **BMC Microbiology**, London, v. 13, n. 1, p. 1 - 15, 2013.
- LINDENBACH, B. D. *et al.* Flaviviridae: the viruses and their replication, 5. ed. Philadelphia, USA: **Lippincott William & Wilkins**, Essex, p. 1101 - 1151, 2007.
- LIRA, G. A. *et al.* Roraimine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Cissampelos sympodialis* roots. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, n. 4, p. 356 - 358, 2002.
- LI, Y. G. *et al.* Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirology**, Basel, v. 56. n.1, p. 6 - 12, 2012.
- LOW, J. G. H. *et al.* Current status of dengue therapeutics research and development. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 215, n. 2, p. 96 - 102, 2017.
- LOW, J. S. Y. *et al.* Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. **Antiviral Therapy**, London, v. 16, n. 8, p. 1203 - 1218, 2011.



- LOZACH, P. Y. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) -mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 25, p. 23698 - 23708, 2005.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 647 - 664, 2004.
- MARIANNEAU, P. *et al.* Infection of primary cultures of human Kupffer cells by dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. **Journal of virology**, Washington, v. 73, n. 6, p. 5201 - 5206, 1999.
- MARINHO, A. F. *et al.* <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments of two new isomeric bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Magnetic Resonance in Chemistry**, Chichester, v. 51, n.5, p. 312 - 315, 2013.
- MASTRANGELO, E. *et al.* Ivermectin is a potent inhibitor of *Flavivirus* replication specifically targeting NS3 helicase activity: New prospects for an old drug. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 67, n. 8, p. 1884 - 1894, 2012.
- MARTINS, R. S. *et al.* Descriptive report of cases of congenital syndrome associated with Zika virus infection in the state of São Paulo, Brazil, from 2015 to 2017. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 2017382, 2018.
- MATUSALI, G. *et al.* Zika virus infects human testicular tissue and germ cells. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 128, n. 10, p. 4697 - 4710, 2018.
- MEAD, P. S. *et al.* Zika virus as a sexually transmitted pathogen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hagerstown, v. 31, n. 1, p. 39 - 44, 2018.
- MEKKY, R. *et al.* Epigallocatechin gallate (EGCG) and miR-548m reduce HCV entry through repression of CD81 receptor in HCV cell models. **Archives of Virology**, Wien, v. 164, n. 6, p. 1587 - 1595, 2019.
- MELO, P. S. *et al.* Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: Cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 143 - 151, 2003.
- MENG, X.Y. *et al.* Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, Sharjah, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.
- MOGHADDAM, E. *et al.* Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. **Scientific Reports**, London, v. 4, p. 1 - 8, 2014.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1 - 2, p. 55 - 63, 1983.
- MOUNCE, B. C. *et al.* Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 142, p. 148 - 157. 2017.
- MUKHTAR, M. *et al.* Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 111 - 120, 2008.
- MUMTAZ, N. *et al.* Cell-line dependent antiviral activity of sofosbuvir against Zika virus. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 146, p. 161 - 163, 2017.
- MUNJAL, A. *et al.* Advances in developing therapies to combat Zika virus: Current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1469, 2017.
- NAWAWI, A. *et al.* Anti-herpes simplex virus activity of alkaloids isolated from *Stephania cepharantha*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 22, n. 3, p. 268 - 274, 1999.
- NÓBREGA, M. E. B. D. *et al.* Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, p. 2017039, 2018.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.
- OO, A. *et al.* Baicalein and baicalin as Zika virus inhibitors. **Archives of virology**, Wien, v. 164, n. 2, p. 585 - 593, 2019.
- OLIVEIRA, F. L. *et al.* Influência das variações climáticas na atividade de vôo das abelhas jandairas *Melipona subnitida* Ducke (*Meliponinae*). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 3, p. 598 - 603, 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue and severe dengue**. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 22 Jul. 2019.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **What is dengue?**. 2019. Disponível em: <http://www.who.int/denguecontrol/disease/en/>. Acesso em: 22 Jul. 2019.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Infecção pelo Zika virus**. 2019. Disponível em: [https://www.paho.org/bireme/index.php?option=com\\_content&view=article&id=312:infeccao-pelo-virus-Zika&Itemid=183&lang=pt](https://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=312:infeccao-pelo-virus-Zika&Itemid=183&lang=pt). Acesso em: 22 Jul. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **O ano em que o vírus Zika evoluiu de uma emergência para um desafio de saúde pública em longo prazo.** 2019. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5326:o-ano-em-que-o-virus-Zika-evoluiu-de-uma-emergencia-para-um-desafio-de-saude-publica-em-longo-prazo&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5326:o-ano-em-que-o-virus-Zika-evoluiu-de-uma-emergencia-para-um-desafio-de-saude-publica-em-longo-prazo&Itemid=812). Acesso em: 22 Jul. 2019.

PADILLA-S, L. *et al.* Inhibitory effects of curcumin on dengue virus type 2-infected cells *in vitro*. **Archives of Virology**, Wien, v. 159, n. 3, p. 573 - 579, 2014.

PAESSLER, S., WALKER, D. H. Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 8, p. 411-440, 2013.

PATRICIO, E. F. L. R. A. *et, al.* The propolis of stingless bees: terpenes from the tibia of three Frieseomelitta species. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 249 - 254, 2002.

PEREIRA, D. S. *et al.* Phytotoxic potential of the geopropolis extracts of the jandaira stingless bee (*melipona subnitida*) in weeds. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 30, n. 4, p. 876 - 884. 2017.

PORTO, N. M. *et al.* Estudo farmacobotânico de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 102 - 107, 2008.

PRADITYA, D. *et al.* Anti-infective properties of the golden spice curcumin. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 10, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6509173/>. Acesso em: 29 Jul. 2019.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493 - 497, 1938.

REGO, M; ALBUQUERQUE, P. Redescoberta de *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae) nas restingas do parque nacional dos Lençóis Maranhenses, Barreirinhas, MA. **Neotrop. Entomol**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 416 - 417, 2006 .

RICE, C. M. *et al*, Nucleotide Sequence of yellow fever virus: implications for *Flavivirus* gene expression and evolution. **Science**, Washington, v. 299, n. 4715, p. 726 - 733, 1985.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, P.A. de Courtaboeuf, v. 37, n.2, p. 124 - 143, 2006.

RUMLOVÁ, M.; RUML, T. In vitro methods for testing antiviral drugs. **Biotechnology advances**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 557-576, 2018.

SAHOO, M. *et al.* Virtual screening for potential inhibitors of NS3 protein of Zika virus. **Genomics & informatics**, Seoul, v. 14, n. 3, p. 104, 2016.

SALEHI, B. *et al.* The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 12, n. 1, p. 1 - 18, 2019.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 6-15, 2009.

SELVEY, L. A. *et al.* Long-term outcomes of Murray Valley encephalitis cases in Western Australia: what have we learnt?. **Internal medicine journal**, Carlton, v. 46, n. 2, p. 193 - 201, 2016.

SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Reviews in medical virology**, Chichester, v. 29, n. 4, p. 2050, 2019.

SHARMA, N. *et al.* Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 104, p. 1046-1054, 2017.

SHERMAN, K. E. *et al.* Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 14, n. 3, p. 1 - 11, 2019.

SILVA, E. C. *et al.* Antileishmanial activity of warifteine: A bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Cissampelos sympodialis* eichl. (Menispermaceae). **The Scientific World Journal**, London, v. 2012, n. 2, p. 408 - 516, 2012.

SILVA, G. R. *et al.* Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado**, Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1017704>. Acesso em: 29 Jul. 2019.

SILVA, S. J. R. *et al.* Development and validation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (rt-lamp) for rapid detection of ZIKV in mosquito samples from Brazil. **Scientific Reports**, London, v. 9, n.1, p. 1 - 12, 2019.

SILVA, T. M. S. **Estudo químico de espécies de *Solanum***. 2002. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

SILVEIRA O. A. F. C. *et al.* Potential antivirals: Natural products targeting replication enzymes of dengue and chikungunya viruses. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 3, p. 505, 2017.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, P.A. de Courtaboeuf, v. 41, n. 3, p. 295 - 311, 2010.

SOUSA, D. M. N. *et al.* Phytochemical screening, *in vitro* toxicity and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of jandaira bee's geopropolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 9, n.2, p. 134 - 140, 2015.

SOUZA, F. B. R. *et al* Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. **Science And Animal Health**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 24 - 37, 2013.

SOUZA, S. A. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geopropolis da abelha sem ferrão jandaira (*Melipona Subnitida* Ducke)**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

SOUZA, S. A. *et al.* **Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaira) bees**. 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/801383/>. Acesso em: 29 Jul. 2019.

SOUZA, S. A. **Estudo químico, atividade antinociceptiva, antifúngica e potencial antioxidante da geopropolis produzida pela jandaira (*Melipona Subnitida* Ducke)**. 2016. Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

STEARMAN, A. M. *et al.* Stradivari us in the jungle: traditional knowledge and the use of "black beeswax" among the yuquí of the Bolivian Amazon. **Human Ecology**, New York, v. 36, n. 2, p. 149 - 159, 2008.

STOWER, H. Zika virus shedding in semen. **Nature Medicine**, New York, v. 24, n. 6, p. 702 - 702, 2018.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. *Flavivirus* membrane fusion. **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 10, p. 2755 - 2766, 2006.

SUKHRALIA, S., *et al.* From dengue to Zika: the wide spread of mosquito-borne arboviruses. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, 2018, v. 38, n. 1, p. 3 - 14, 2019.

TANG, L. I. C. *et al.* Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 12, n. 1, p. 3, 2012.

TASSANEETRITHEP, B. *et al.* DC-SIGN (CD209) Mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, Tokyo, v. 197, n. 7, p. 823 - 829, 2003.

CERQUEIRA-LIMA, A. T. *et al.* Effects of *Cissampelos sympodialis* Eichl. and its alkaloid, warifteine, in an experimental model of respiratory allergy to *blomia tropicalis*. **Current Drug Targets**, Saif Zone, Xv. 11, p. 1458 - 1467, 2010.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, New York, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VÁZQUEZ-CALVO, Á. *et al.* Antiviral properties of the natural polyphenols delphinidin and epigallocatechin gallate against the *Flaviviruses* West Nile virus, Zika virus, and dengue virus. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1314, 2017.

WAHID, B. *et al.* Current status of therapeutic and vaccine approaches against Zika virus. **European Journal of Internal Medicine**, Amsterdam, v. 44, p. 12 - 18, 2017.

WANG, C. Y. *et al.* Epigallocatechin-3-gallate inhibits the early stages of Japanese encephalitis virus infection. **Virus research**, Amsterdam, v. 253, p. 140 - 146, 2018

WILDER-SMITH, A. *et al.* Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet infectious diseases**, New York, v. 17, n. 3, p. 101 - 106, 2017.

WU, S.H. *et al.* Successful treatment with sofosbuvir and daclatasvir plus ribavirin in acute hepatitis C-infected patient with hepatic decompensation. **Journal of the Chinese Medical Association**. Taipei, v. 82, n.7, p. 595 - 598. 2019.

XU, H. T. *et al.* Evaluation of sofosbuvir ( $\beta$ -D-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methyluridine) as an inhibitor of dengue virus replication. **Scientific reports**, London, v. 7, n. 1, p. 6345, 2017.

XU, T. L. *et al.* Antivirus effectiveness of ivermectin on dengue virus type 2 in *Aedes albopictus*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 12, n. 11, p. 0006934, 2018.

ZANDI, K. *et al.* *In vitro* antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 23, p. 5534 - 5539, 2011.

ZHANG, J., *et al.* Quality of herbal medicines: challenges and solutions. **Complementary therapies in medicine**, Edinburgh, v. 20, n. 1-2, p. 100 - 106, 2012.