



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

STEPHANNIE JANAINA MAIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS VERMELHA  
DE ALAGOAS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA *IN VITRO***

Maceió/AL  
2021

STEPHANNIE JANAINA MAIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA PRÓPOLIS VERMELHA  
DE ALAGOAS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alagoas, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

Coorientadora: Profa. Dra. Letícia Anderson

Maceió/AL  
2021

**Catálogo na Fonte Universidade  
Federal de Alagoas Biblioteca Central  
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S729a Souza, Stephannie Janaina Maia de.

Avaliação da atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas contra o vírus Chikungunya *in vitro* / Stephannie Janaina Maia de Souza. – 2021.  
63 f. : il. color.

Orientador: Ênio José Bassi.

Coorientadora: Letícia Anderson.

Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 55-61.

Apêndices: f. 62-63.

1. Vírus Chikungunya. 2. Própolis. 3. Atividade antiviral. I. Título.

CDU: 615.281.8

A minha família  
Aos meus amigos de vida e de laboratório.  
Vocês foram fundamentais para que chegasse até aqui.

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente à Deus em sempre me guiar e mostra o melhor caminho a seguir na vida, além de colocar pessoas maravilhosas próximas a mim.*

*Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, enquanto oportunidade de instituições públicas, que me permitiram desenvolver meus projetos.*

*A Fundação de Amparo a Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) e a CAPE pelo suporte financeiro durante todo o desenvolvimento do mestrado.*

*Ao meu querido pai Alvacir (in memorian) que mesmo não estando ao meu lado durante minha vida e acompanhado meu desenvolvimento sempre esteve em meu coração me guiando e mostrando o melhor caminho.*

*Ao meu amado irmão Anderson Maia e minha mãe Janete Maia que são os grandes motivos de esforço e determinação que tenho em minha vida e são os meus exemplos de vida e orgulho.*

*Ao meu querido orientador Professor Dr. Ênio pela oportunidade e aprendizado construído durante todo meu mestrado e principalmente por incentivar sempre o meu trabalho e elevar minha autoestima científica e comemorar a cada resultado bom e apoio quando os resultados não eram como o esperado. Aprendi muito com o senhor Agradeço de coração por trabalhar com o senhor e por toda oportunidade em crescer profissionalmente. Sou sua fã.*

*A minha querida Co-orientadora e rainha da biomol, Professora Dra. Letícia Anderson Bassi por aceitar ser minha co-orientadora e agradeço por todas as contribuições nesse trabalho e todo apoio e incentivo que foram muito relevantes. Sou muito grata por ter sido sua aluna e ter aprendido tanto com a senhora.*

*Ao meu amigo e colega de antiviral Fábio Santos, por toda sua ajuda e amizade durante sua trajetória pelo laboratório, sou muito grata de ter trabalhado com você.*

*Ao Professor Dr. Ticiano Gomes pela colaboração nas análises dos extratos e frações da própolis, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Professor Dr. Edeildo pela colaboração com as análises de Docking molecular o que possibilitou o enriquecimento deste trabalho.*

*Aos integrantes do LAPEVI por me acolherem durante esses 7 anos que sou integrante do laboratório e pude aprender muito com todos, em especial a Professora Dr. Alessandra Abel Borges pelo fornecimento de equipamentos que foram necessário para o desenvolvimento deste trabalho e a técnica Ana Rachel por sempre se dispor a ajudar todos nós.*

*Aos meus amigos e estudantes no Grupo de pesquisa IMUNOREG e segunda família, Elane Santos, Jamile Taniele, Grazielle Lobo, Káthia Laura, Júlia Brandão, João Pedro, agradeço de coração a cada um de vocês que foram responsáveis também pela execução deste trabalho, agradeço todo carinho, discussões que contribuíram para este trabalho e incentivo sem vocês a execução deste trabalho não seria possível.*

*Ao meu noivo João Pedro, companheiro de vida e laboratório, que sempre me apoiou, me alegrou e fez tudo que estava a seu alcance para me ajudar a chegar até aqui. Além de me dar um presente mais importante e fundamental para que eu lute*

*todos os dias que é a nossa filha Laura.*

*Por fim, agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para que este trabalho fosse concretizado. A vocês, gratidão!*

## RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) ocasiona a febre Chikungunya que pode progredir para a fase crônica caracterizada por uma artralgia persistente. Atualmente, não existem antivirais ou vacinas licenciadas contra esse vírus. A própolis vermelha de Alagoas (PVA) é uma resina natural que as abelhas produzem pela mistura de saliva e exsudato de plantas que apresentam atividades antimicrobianas. Portanto, nosso objetivo foi caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antiviral da PVA e suas frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE) contra o CHIKV *in vitro*. Inicialmente, o CHIKV foi isolado do soro de pacientes infectados na fase aguda da doença, replicado em células Vero E6, sendo sua detecção confirmada por RT-PCR usando iniciadores para a região genômica da proteína E1 (882 pb). Por meio do sequenciamento de DNA e análise filogenética (software MEGA7), detectou-se o CHIKV como pertencente ao genótipo ECSA (do inglês “*East/Central/South African*”). A caracterização química da PVA foi realizada por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC-DAD), detectando-se a presença dos marcadores liquiritigenina, pinobanksina, daidzeína, formononetina, biochanina A e isoliquiritigenina. A citotoxicidade da PVA em células Vero E6 pelo ensaio colorimétrico MTT mostrou uma  $CC_{50}$  para o extrato hidroalcoólico PVA (EH), FH e FAE de 200,1, 22,6 e  $> 40,0$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Para os ensaios de atividade antiviral, a adsorção viral foi realizada por 2h em células Vero E6, seguida pelo tratamento com diferentes concentrações de soluções de PVA por 72h e posterior análise de viabilidade celular por MTT. Como resultado, uma atividade antiviral promissora foi detectada e as  $CI_{50}$  do EH, FH e FAE foram 22,80  $\mu\text{g/mL}$ , 4,24  $\mu\text{g/mL}$  e 5,34  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Além disso, foram obtidos altos índices de seletividade (IS) para os compostos (HE = 8,7, HF = 5,3 e FAE  $> 7,5$ ). Para confirmar a atividade antiviral, foi realizada a marcação intracelular do vírus 48h após o tratamento seguido da análise da percentagem de células positivas por citometria de fluxo. Todas as soluções de PVA testadas apresentaram efeito de redução maior que 50% na percentagem de células positivas infectadas. No ensaio de inativação viral, inicialmente suspensões do CHIKV foram incubadas diretamente com a PVA por 2h, seguido da diluição e infecção de células Vero E6 para posterior avaliação pelo ensaio de unidades formadoras de placa (PFU) onde uma redução significativa no número de PFUs foi detectada [4.867 PFU/mL (EH), 12.767 PFU/mL (FH) e 8.867 PFU/mL (FAE) vs. controle viral sem tratamento = 31.000 PFU/mL]. Para avaliar em quais estágios da infecção viral os compostos estariam agindo, as células foram tratadas com PVA ou suas frações por 2h antes da infecção pelo CHIKV, simultaneamente a infecção (0h), ou por diferentes tempos pós-infecção (2h, 4h e 6h). Como resultado, a atividade inibitória foi detectada 2h, 4h e 6h pós-infecção para EH e FH e 2h e 4h pós-infecção para FAE. Para analisar a atividade dos compostos detectados por UPLC-DAD frente às proteínas do envelope maduro do CHIKV, foi realizado um estudo *in silico* de Docking molecular; como resultado todos os compostos detectados apresentaram como alvo de suas atividades o complexo de glicoproteínas E3-E2-E1 do CHIKV. Assim, os dados obtidos no presente estudo demonstram a promissora atividade antiviral da PVA contra o CHIKV *in vitro*, contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para esta arbovirose.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya, Própolis vermelha, atividade antiviral

## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) causes Chikungunya fever disease that can progress to the chronic phase characterized by persistent arthralgia. There are currently no antivirals or licensed vaccines against this virus. Alagoas Red Propolis (ARP) is a natural resin that bees produce by mixing saliva and exudate from plants that have antimicrobial activities. Therefore, our objective was the chemical characterization and evaluate the antiviral activity of ARP and its hexanic (HF) and ethyl acetate fractions (EAF) against CHIKV *in vitro*. First, CHIKV was isolated from serum of infected-patients in the acute viremia phase of the disease, replicated in Vero E6 cells and confirmed by RT-PCR using primers for the E1 protein genomic region (882 bp). DNA sequencing and phylogenetic analysis (MEGA7 software) confirmed East/ Central/ South African (ECSA) as the CHIKV genotype. The chemical characterization of ARP was performed by ultra performance liquid chromatography (UPLC-DAD) and the presence of the liquiritigenin, pinobanksin, daidzein, formononetin, biochanin A and isoliquiritigenin markers were detected. The ARP cytotoxicity in Vero E6 cells was evaluated by MTT colorimetric assay and  $CC_{50}$  values of 200.1  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , 22.6  $\mu\text{g} / \text{mL}$  and  $> 40.0 \mu\text{g} / \text{mL}$  was obtained for the hydroalcoholic extract (HE), HF and EAF, respectively. For the antiviral activity assays, CHIKV adsorption was performed for 2h on Vero E6 cells, followed by treatment with different concentrations of ARP solutions for 72h and cell viability analysed by MTT assay. As result, a promising antiviral activity was detected and the  $IC_{50}$  values were 22.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4.24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 5.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the HE, HF and EAF, respectively. In addition, high selectivity indices (SI) were obtained for the compounds (HE = 8.7, HF = 5.3 and EAF  $> 7.5$ ). In order to confirm the antiviral activity, virus intracellular labeling was performed and the percentage of positive cells was detected by flow cytometry 48h after infection. As result, all tested ARP solutions showed a reduction effect higher than 50% on the percentage of infected cells. In the inactivation assay, CHIKV suspensions were first incubated with ARP for 2h, diluted and incubated for 48h, followed by the detection of the plaque-forming units (PFU), and a reduction in the number of PFUs was detected [4,867 PFU / mL (HE), 12,767 PFU / mL (HF) and 8,867 PFU / mL (EAF) vs. 31,000 PFU / mL untreated viral control]. In addition, to assess which stages of viral infection the compounds are acting on, cells were treated with ARP and their fractions for 2 h before CHIKV infection, simultaneously with infection (0h), or for different times post-infection (2 h, 4 h and 6 h). The inhibitory activity was detected 2h, 4h and 6h after infection at HE and HF assays, and 2h and 4h after infection at EAF assay. To analyze the activity of the compounds detected by UPLC-DAD against CHIKV mature envelope proteins, an *in silico* study of molecular docking was carried out. All detected compounds showed to target the glycoproteins of E3-E2-E1 CHIKV complex. Thus, the data obtained in the present study demonstrate the promising antiviral activity of ARP against CHIKV *in vitro*, contributing to the development of new therapeutic agents for this arbovirus.

Keywords: Chikungunya virus, red propolis, antiviral activity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo da estrutura molecular e genoma do vírus Chikungunya .....	11
Figura 2: Proteínas estruturais e não estruturais do vírus Chikungunya.....	12
Figura 3: Ciclo replicativo do vírus Chikungunya .....	14
Figura 4: Distribuição global do vírus Chikungunya até setembro de 2019.....	16
Figura 5: Sintomas da FCHIKV na fase aguda .....	17
Figura 6: Abelhas <i>Apis mellifera</i> coletando o exsudato na leguminosa <i>Dalbergia ecastophyllum</i> .....	20
Figura 7: Atividades biológicas da própolis vermelha .....	21
Figura 8: Isolamento do vírus Chikungunya circulante em Alagoas. ....	35
Figura 9: Monocamadas de células C6/36 após 5 dias de infecção viral.....	36
Figura 10: Caracterização da amostra de Chikungunya circulante em Alagoas utilizada para isolamento viral.....	37
Figura 11: Marcadores da Própolis Vermelha de Alagoas por UPLC-DAD.....	38
Figura 12: Ensaio de citotoxicidade da própolis vermelha de Alagoas e suas frações em células Vero E6 por 72 horas. ....	41
Figura 13: Avaliação da atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas e suas frações contra o vírus Chikungunya no ensaio de pós-tratamento.....	43
Figura 14: Determinação da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por citometria de fluxo intracelular. ....	45
Figura 15: Ensaio de inativação viral .....	46
Figura 16: Ensaio do tempo de adição de droga da atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas e suas frações contra CHIKV em células Vero E6 por 72 h .....	48
Figura 17: Constituintes químicos da própolis vermelha com complexo glicoproteico E3-E2-E1 maduro .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da própolis brasileira .....	19
Tabela 2: Compostos presentes na PVA e suas atividades biológicas. ....	22
Tabela 3: Parâmetros cromatográficos: tempos de retenção (TR), comprimento de onda máximo e concentração do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas e suas frações. ....	40
Tabela 4: Valores de CC50, CI50 e IS do EH e frações FH e FAE no ensaio pós-tratamento. Os valores representam a média $\pm$ S.E.M. de três experimentos independentes em triplicata.....	44
Tabela 5: Interações dos componentes em um potencial local de ligação complexo E3-E2-E1 do envelope viral .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATCC:** American Type Culture Collection

**CHIKV:** Vírus Chikungunya

**CMNT:** concentração máxima não tóxica

**DENV-2:** Vírus Dengue tipo 2

**ECSA:** *East/Central/South African*

**EH:** Extrato hidroalcoólico

**FAE:** Fração acetato de etila

**FCHIKV:** Febre Chikungunya

**FH:** Fração hexânica

**MTT:** Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

**ORF:** *Open reading frame*

**PDB:** Protein Data Bank

**PFU:** Unidades Formadoras de placa

**PVA:** Própolis vermelha de Alagoas

**qRT-PCR:** PCR em tempo real quantitativa

**SFB:** Soro fetal bovino

**TR:** Tempo de retenção

**UPLC-DAD:** Cromatografia líquida de ultra performance

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	11
2.1 Vírus Chikungunya .....	11
2.1.1 Proteínas estruturais e não estruturais .....	11
2.1.2 Ciclo de Replicação Viral.....	13
2.1.3 Genótipos virais.....	15
2.1.4 Febre Chikungunya .....	16
2.2 Própolis Brasileira.....	17
2.2.1 Própolis Vermelha de Alagoas .....	20
2.3 Potenciais alvos de ação de drogas antivirais .....	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos .....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Células e manutenção .....	28
4.2 Isolamento viral e caracterização molecular do CHIKV .....	28
4.3 Obtenção do estoque viral e titulação do CHIKV.....	29
4.4 Amostra de própolis vermelha de Alagoas (PVA).....	29
4.5 Caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	30
4.6 Ensaio de Citotoxicidade .....	30
4.7 Ensaio de pós-tratamento.....	31
4.8 Análise da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por marcação intracelular por citometria de fluxo .....	32
4.9 Ensaio de inativação viral .....	32
4.10 Ensaio de tempo de adição de droga.....	33
4.11 Análise de docking molecular <i>in silico</i> .....	33
4.12 Análise estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Isolamento e caracterização molecular do CHIKV .....	35
5.2 Propagação e titulação do CHIKV.....	36
5.3 Análise filogenética viral .....	36
5.4 Caracterização química por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
5.5 Ensaio de Citotoxicidade .....	41
5.6 Ensaio de pós-tratamento.....	42
5.7 Análise da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por marcação intracelular por citometria de fluxo .....	44
5.8 Inativação Viral .....	45
5.9 Ensaio do tempo de adição de droga.....	46

5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÃO.....	54
7	REFERÊNCIAS.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes (do inglês, “*arthropod-borne viruses*”) e consistem um grande problema de saúde pública mundial devido a sua rápida transmissão e disseminação entre indivíduos.

Dentre os inúmeros arbovírus de importância clínica no Brasil e no mundo, destaca-se o vírus Chikungunya (CHIKV), agente etiológico da Febre Chikungunya (CHIKVF). Este vírus é transmitido pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* infectados. A CHIKVF é caracterizada por ocasionar uma poliartralgia severa, responsável pelo afastamento de diversos indivíduos de suas atividades laborais, além de estar relacionada com o comprometimento de diversos órgãos (olhos, pele e rins) e sistemas (nervoso e cardiovascular) (TAUBITZ et al., 2007). No Brasil, esta doença também tem ocasionado óbitos nos últimos anos (BRASIL, 2017b, 2018).

O desenvolvimento de fármacos antivirais é um processo complexo, pois os vírus são microrganismos intracelulares que dependem da célula viva para realizarem a biossíntese de novas partículas virais. Até o presente momento não há medicamentos antivirais específicos licenciados para o tratamento desta infecção, enfatizando a necessidade de descoberta de novos compostos com atividade antiviral (DE CLERCQ, 2005; RICE; BADER, 1995).

Neste contexto, compostos derivados de plantas têm um papel relevante entre os produtos de origem natural, apresentando diversas propriedades biológicas, incluindo-se a atividade antiviral (JASSIM; NAJI, 2003). Dentre esses produtos naturais, destaca-se a própolis que é uma resina natural que se caracteriza por ser uma mistura de componentes químicos originados a partir da coleta do exsudato de plantas e do metabolismo da abelha (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

A própolis brasileira é classificada em 13 grupos de acordo com a sua origem botânica e localização geográfica. Dentre os diversos tipos de própolis presentes no Brasil destaca-se a própolis vermelha que tem sua origem botânica na leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como “rabo de bugio”, possuindo diversas propriedades biológicas incluindo-se a atividade antiviral (SIMONI et al., 2018). A PVA é rica em metabólitos secundários denominados flavonoides (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016) que possuem diversas atividades biológicas, destacando-se a atividade antiviral (AHMADI et al., 2016; GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017).

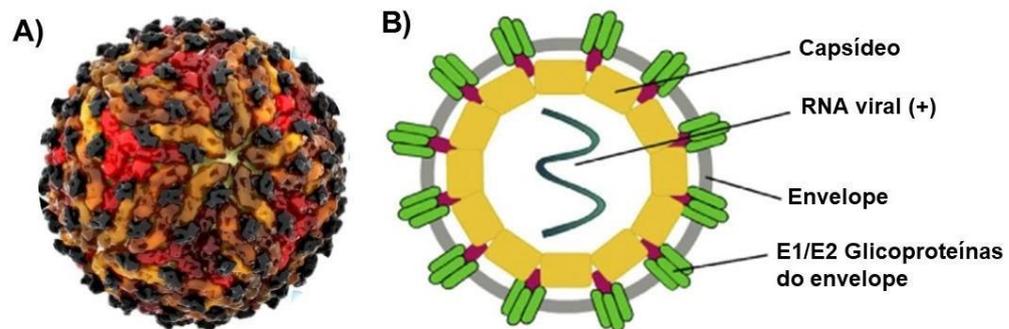
No entanto, a atividade da PVA contra o CHIKV ainda não foi descrita até o presente momento.

Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antiviral da PVA contra o CHIKV *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Vírus Chikungunya

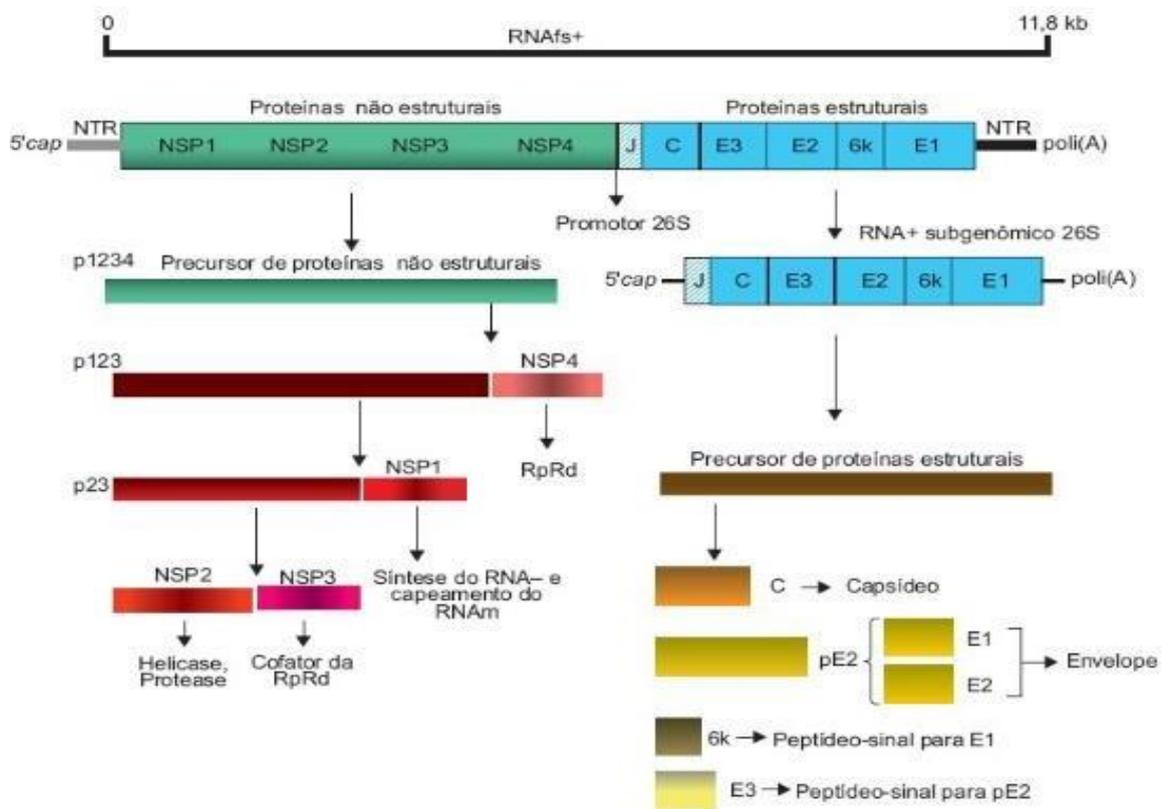
O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*), sua partícula viral é esférica e seu capsídeo possui uma simetria icosaédrica (~70 nm). Seu genoma é composto por um RNA de fita simples de polaridade positiva (+ssRNA) com tamanho aproximado de 11,8 kb com duas sequências de leitura aberta (*Open reading frame - ORF*) que codificam quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos (E3 e 6k) (SANTOS, 2015) (Figura 1).



**Figura 1. Estrutura da partícula viral do vírus Chikungunya-** (A) Estrutura do virion. Fonte: (DA SILVA-JÚNIOR et al., 2017). (B) Representação esquemática da partícula viral contendo a proteína do capsídeo (C) e proteínas do envelope E1 e E2. Fonte: Adaptado de (CASTILLO-MACÍAS; SALINAS-CARMONA; TORRES-LÓPEZ, 2018).

#### 2.1.1 Proteínas estruturais e não estruturais

A ORF 3 é traduzida a partir do promotor 26S em um RNA subgenômico que codifica uma poliproteína precursora que, após sucessivas clivagens, dá origem às proteínas de capsídeo (C), as glicoproteínas E1, E2 e E3 e ao pequeno peptídeo 6K (Figura 2) (SANTOS, 2015).



**Figura 2. Proteínas estruturais e não estruturais do vírus Chikungunya-** O genoma é capeado e poliadenilado nas terminações 5 e 3, respectivamente; o genoma viral contém 2 ORFs e 1 região de junção. A ORF 5 codifica 4 proteínas estruturais (nsP1 – nsP4) que são traduzidas a partir do genoma. A ORF 3 é traduzida a partir do promotor 26S em 1 RNA subgenômico que codifica as proteínas de capsídeo (C), as glicoproteínas de superfície (E1 e E2) e 2 peptídeos menores E3 e 6k. As proteínas estruturais e não estruturais são geradas a partir da clivagem proteolítica de poliproteínas precursoras. Fonte: (SANTOS, 2015)

As glicoproteínas E1 e E2 interagem entre si formando heterodímeros compondo as espículas virais, que participam da entrada do vírus na célula hospedeira (LEUNG; NG; CHU, 2011). A glicoproteína E2 participa do processo de adsorção, tendo em vista que estabelece uma ligação entre a partícula viral e os receptores da célula hospedeira (SMITH et al., 1995). A glicoproteína E1 está envolvida no processo de fusão do envelope viral com a membrana do endossomo a fim de liberar o nucleocapsídeo no citosol da célula (SOLIGNAT et al., 2009).

A proteína E3 é responsável pelo dobramento adequado de pE2 (precursor da E2), mas é liberada do CHIKV maduro após o brotamento (MULVEY; BROWN, 1996; SUN et al., 2013). O peptídeo 6K atua como uma sequência sinal na translocação da E1, sendo essencial para montagem da partícula viral. Além disso essa proteína foi classificada como uma viroporina, pois possui a capacidade de formar canais de íons e

alterar a permeabilidade da membrana (LEUNG; NG; CHU, 2011; SOLIGNAT et al., 2009).

A ORF 5' é diretamente traduzida do RNA genômico para uma poliproteína precursora de quatro proteínas não estruturais (nsPs) (STRAUSS; STRAUSS, 1994). A nsP1 está envolvida no encapsulamento do RNA viral de cadeia positiva funcionando como uma âncora da membrana do complexo de replicação com atividades de metiltransferase e guaniltransferase (FROS; PIJLMAN, 2016; RUPP et al., 2015).

A nsP2 está envolvida no processamento autocatalítico da poliproteína não estrutural P1234, apresentando três funções importantes, pois age como uma helicase, trifosfatase e protease, além de apresentar intimamente uma função na inativação de síntese macromolecular da célula hospedeira (KIIVER et al., 2008; LULLA et al., 2006; MERITS et al., 2001).

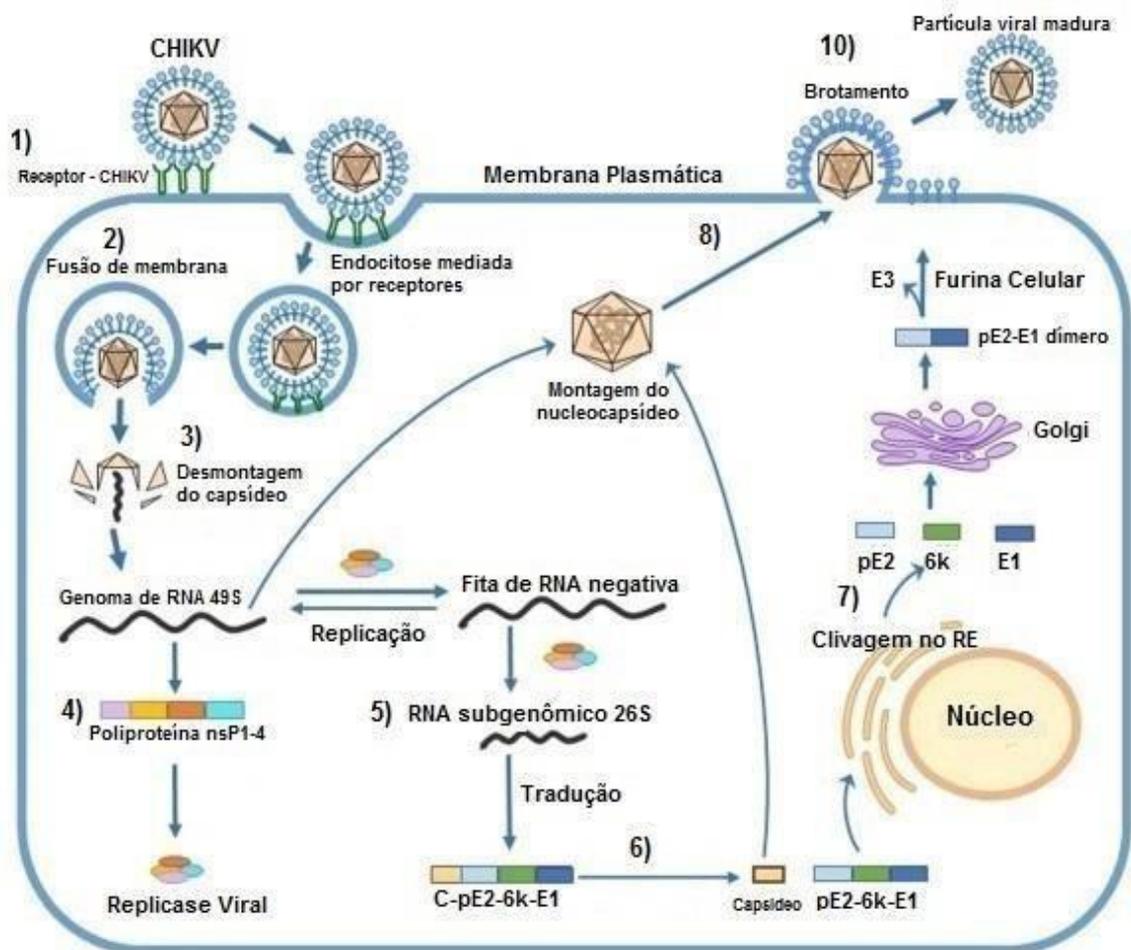
A função da nsP3 ainda não está bem elucidada. Sua organização se dá em três domínios: amino-terminal, uma região específica central e uma sequência hipervariável carboxi-terminal (SHIN et al., 2012). A nsP4, por sua vez, é uma RNA polimerase RNA-dependente, sendo parte importante no complexo de replicação viral (TOMAR et al., 2006).

### **2.1.2 Ciclo de Replicação Viral**

Em células de vertebrados, o CHIKV é capaz de se replicar em menos de oito horas em temperaturas corporais de 37 °C (SOURISSEAU et al., 2007; TENG et al., 2011). Inicialmente, o vírus adere a fatores de ligação presentes na superfície da célula, incluindo os glicosaminoglicanos (MCALLISTER et al., 2020). Em seguida, a entrada do vírus é facilitada pela interação da glicoproteína E2 com receptores de superfície celular na célula hospedeira (SOURISSEAU et al., 2007; TENG et al., 2011), como a proibitina (WINTACHAI et al., 2012) e a molécula de adesão celular MXRA8 (ZHANG et al., 2018). Após a ligação ao receptor celular, o vírus é rapidamente internalizado por endocitose mediada por clatrin. Após a endocitose, o pH ácido no endossoma induz mudanças conformacionais, permitindo a fusão à membrana do endossoma, resultando na liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular, onde ocorre sua desmontagem para liberação do genoma viral (Figura 3) (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; SANTOS, 2015). Na fase inicial da replicação, o RNA genômico funciona como RNAm para a tradução da poliproteína não estrutural nsP123 e nsP1234 e proteína nsP4 livre, que interagem com as proteínas da célula hospedeira para formar um complexo de replicação para a síntese de RNA de

polaridade negativa (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015).

O RNA de polaridade negativa é utilizado para sintetizar o RNA genômico de polaridade positiva, e o RNA 26S funciona como um RNAm sendo traduzido em uma poliproteína precursora estrutural C-pE2-6K-E1. Essa poliproteína é processada e clivada pela atividade serino-protease da nsP2 liberando a proteína do capsídeo (C), enquanto a poliproteína pE2-6K-E1 é processada no retículo endoplasmático (RE) em pE2 e E1. Essas proteínas são levadas ao complexo de Golgi onde são glicosiladas e migram para a membrana plasmática. Durante essa migração, a pE2 é clivada por uma furina celular ou proteinases do tipo furina para formar as proteínas estruturais E2 e E3 maduras. As partículas virais saem por brotamento através da membrana celular adquirindo um envelope de bicamada lipídica contendo as glicoproteínas E1 e E2 conforme mostrado na figura 3 (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015).



**Figura 3. Ciclo replicativo do vírus Chikungunya-**1) Ligação do vírus ao receptor celular, 2) Fusão da membrana endossômica a proteínas do envelope, 3) Desmontagem do nucleocapsídeo para a liberação do RNA viral, 4) que é traduzido para produzir as proteínas não estruturais virais (nsP1–4) através da replicase viral, 5) RNA de fita negativa serve como molde para síntese do genoma de fita positiva completo e o RNA subgenômico (26S), 6) Clivagem da poliproteína C-pE2-6k-E1 liberando a

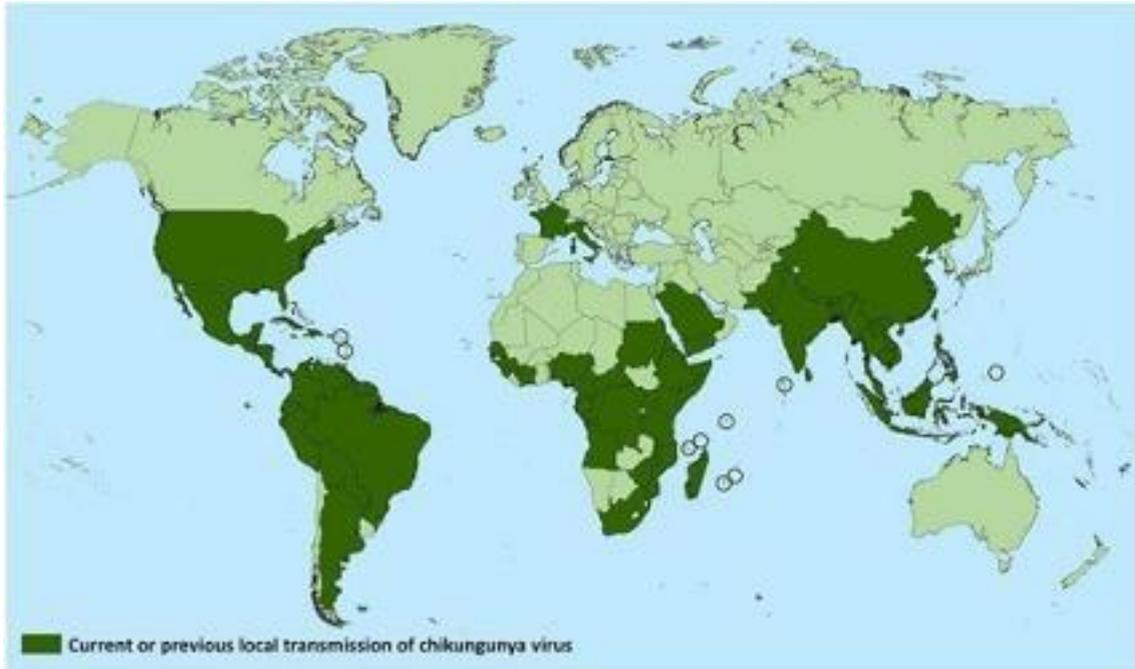
proteína do capsídeo 7) e clivagem no RE para a produção de proteínas estruturais 8) montagem dos componentes virais, 9) liberação da partícula viral por brotamento. Adaptado de ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015.

### 2.1.3 Genótipos virais

As análises de sequências do genoma viral têm classificado filogeneticamente o CHIKV em genótipos nomeados de acordo com a localização geográfica do primeiro isolamento viral, sendo assim, descritos três variantes genotípicas, denominadas genótipo ECSA (do inglês, “*East/Central/South African*”), Asiático e do Oeste Africano (do inglês, “*West African*”) (POWERS et al., 2001).

O vírus foi isolado pela primeira vez no planalto de Newala (atual Tanzânia), em 1953, a partir de amostras de soro de pacientes durante uma epidemia de dengue (ROSS, 1956), permanecendo endêmico na África e na Ásia. Porém, os anos de 2005 e 2006 foram marcados pelo ressurgimento do vírus com quase um milhão de casos suspeitos na Ilha de *La Reunion*, no Oceano Índico (SCHUFFENECKER et al., 2006). Desde então o vírus tem se espalhado ao redor do mundo sendo reportado em mais de 100 países conforme mostrado na figura 4 (CDC, 2019).

No Brasil, o CHIKV foi detectado pela primeira vez no ano de 2014 em um surto em Oiapoque/AP sendo o genótipo asiático identificado naquela ocasião. No mesmo ano, o genótipo ECSA foi identificado em um surto em Feira de Santana/BA (NUNES et al., 2015), e desde então, ambos genótipos co-circulam no país (CHARLYS DA COSTA et al., 2017; NAVECA et al., 2019).



**Figura 4. Distribuição global do vírus Chikungunya até setembro de 2019-** Países e territórios onde foram reportados casos de infecção pelo vírus Chikungunya estão marcados em verde escuro. Fonte: CDC, 2019.

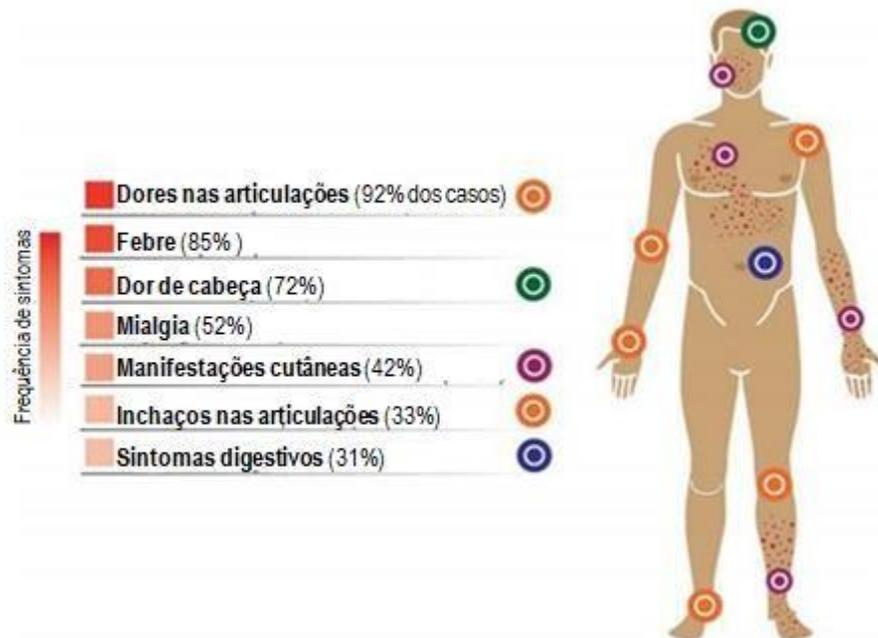
#### 2.1.4 Febre Chikungunya

A CHIKVF é uma arbovirose causada pelo CHIKV, transmitido aos humanos por mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que estão distribuídos tanto em áreas urbanas quanto rurais (DHIMAL et al., 2015; NSOESIE et al., 2016; TSETSARKIN et al., 2007).

No Brasil, no período de janeiro de 2016 até março de 2021, de acordo com dados de boletins do Ministério da Saúde, foram reportados cerca de 520.000 casos prováveis desta infecção sendo sua maioria reportada na Região Nordeste (cerca de 460.000 casos). No estado de Alagoas, neste mesmo período, foram reportados cerca de 20.000 casos suspeitos da CHIKVF (BRASIL, 2021).

Nesta arbovirose, estudos mostram que aproximadamente 70% da população infectada apresenta a forma sintomática da doença por apresentar sintomas como dor de cabeça intensa, erupções cutâneas, manifestações gastrointestinais, febre aguda e mialgia (Figura 5) com possível progressão em uma parte dos pacientes para uma poliartralgia crônica de caráter debilitante (TANABE et al., 2018b) podendo perdurar por até 72 meses (VAN AALST et al., 2017). No Brasil, esta infecção tem sido responsável pelo afastamento de diversos indivíduos de suas atividades profissionais

(BRASIL, 2017a, 2018). Além disso, nos anos de 2016 a junho de 2019, foram confirmados 312 casos de óbitos relacionados a infecção por este vírus, de acordo com boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde.



**Figura 5. Sintomas da FCHIKV na fase aguda-** Frequência dos principais sintomas observados na fase aguda da infecção pelo CHIKV, sendo as dores articulares presentes na maioria dos casos (92%). Fonte: Adaptado de TANABE et al., 2018.

Apesar dessa infecção ser um grave problema de saúde pública, ainda não existem fármacos antivirais ou vacinas disponíveis para o tratamento e/ou prevenção desta arbovirose (CHAUDHURI; SYMONS; DEVAL, 2018). Assim, o tratamento utilizado atualmente consiste em medicamentos paliativos aliviando as dores relatadas pelo paciente (BRASIL, 2018). A terapia atual consiste no uso de analgésicos, antipiréticos e agentes anti-inflamatórios, como paracetamol e anti-inflamatórios não esteroidais (THIBERVILLE et al., 2013).

Embora muitas sejam as infecções virais, incluindo a ocasionada pelo CHIKV, poucos são os fármacos disponíveis contra essas infecções. Até o ano de 2017, apenas 88 fármacos antivirais foram aprovados e licenciados, sendo sua maioria utilizados para o tratamento contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CHAUDHURI; SYMONS; DEVAL, 2018).

## 2.2 Própolis Brasileira

Diversos estudos têm mostrado atividades biológicas promissoras de compostos de origem natural incluindo a atividade antiviral contra o CHIKV, ressaltando assim a grande relevância de pesquisas na tentativa de descoberta de protótipos antivirais de origem natural contra este vírus (BHAKAT; SOLIMAN, 2015; JASSIM; NAJI, 2003; YU et al., 2018). Dentre os diversos compostos de origem natural destaca-se a própolis.

A própolis é uma resina natural originada a partir da coleta de brotos e do exsudato de plantas e do metabolismo da abelha que se misturam com suas secreções salivares, cera e pólen (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004) com a função principal de proteção da colmeia (ATHIKOMKULCHAI et al., 2013). A sua coloração e composição química variam de acordo com a sazonalidade e espécies de plantas utilizadas na coleta pelas abelhas (BARTH; DA LUZ, 2009; SFORCIN et al., 2001). A própolis brasileira é classificada em 13 grupos de acordo com sua coloração, havendo para algumas a caracterização de sua composição química, origem botânica e registro de origem geográfica (DAUGSCH et al., 2006) (Tabela 1).

Estudos apontam atividades biológicas presentes na própolis, tais como: antioxidante e cardioprotetora (AHMED et al., 2017), imunomoduladora e anti-inflamatória (SANTIAGO et al., 2016), antimicrobiana (VELOZ; ALVEAR; SALAZAR, 2019), além de atividade antiviral contra os vírus HIV, HSV-1 e 2, e poliovírus (BÚFALO et al., 2009; GEKKER et al., 2005; SCHNITZLER et al., 2010; YILDIRIM et al., 2016).

**Tabela 1.** Classificação da própolis brasileira. Adaptado de MENDONÇA, 2011.

Própolis	Origem geográfica	Cor	Origem Botânica	Composição Química	Referência
<b>Grupo 1</b>	RS	Amarelo	-	-	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002)
<b>Grupo 2</b>	RS	Castanho claro	-	-	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002)
<b>Grupo 3</b>	PR	Castanho escuro	<i>Populus alba</i>	Éster do ácido dimetil dialil caféico; flavonoides: pinobanksina, piocembrina e crisina dentre outros.	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SILVA, 2008)
<b>Grupo 4</b>	PR	Castanho Claro	-	-	-
<b>Grupo 5</b>	PR	Marrom esverdeado	-	-	-
<b>Grupo 6</b>	BA	Marrom avermelhado	<i>Hyptis divaricata</i>	Ésteres de ácidos graxos, compostos aromáticos, Terpenos, Flavonóides	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SILVA, 2008)
<b>Grupo 7</b>	BA	Marrom esverdeado	-	-	-
<b>Grupo 8</b>	PE	Castanho escuro	-	-	-
<b>Grupo 9</b>	PE	Amarelo	-	-	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; SILVA, 2008)
<b>Grupo 10</b>	CE	Amarelo escuro	-	-	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002)
<b>Grupo 11</b>	PI	Amarelo	-	-	(PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002)
<b>Grupo 12</b>	SP, MG	Verde ou marrom esverdeado	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Flavonoides, ácidos fenólicos, cetonas aldeídos aromáticos, terpenos, terpenos e hidrocarbonetos.	(BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; FUNARI; FERRO, 2006; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002)
<b>Grupo 13</b>	AL, BA e PB	Vermelha	<i>Dalbergia ecastophillum</i>	Flavonóides: daidzeína, liquiritigenina, pinobanksina, formononetina, isoliquiritigenina, biochanina A, pinoembrina, rutina, quercetina (entre outros), ácido fenólico (ácido felúrico)	PORTO et al., 2018

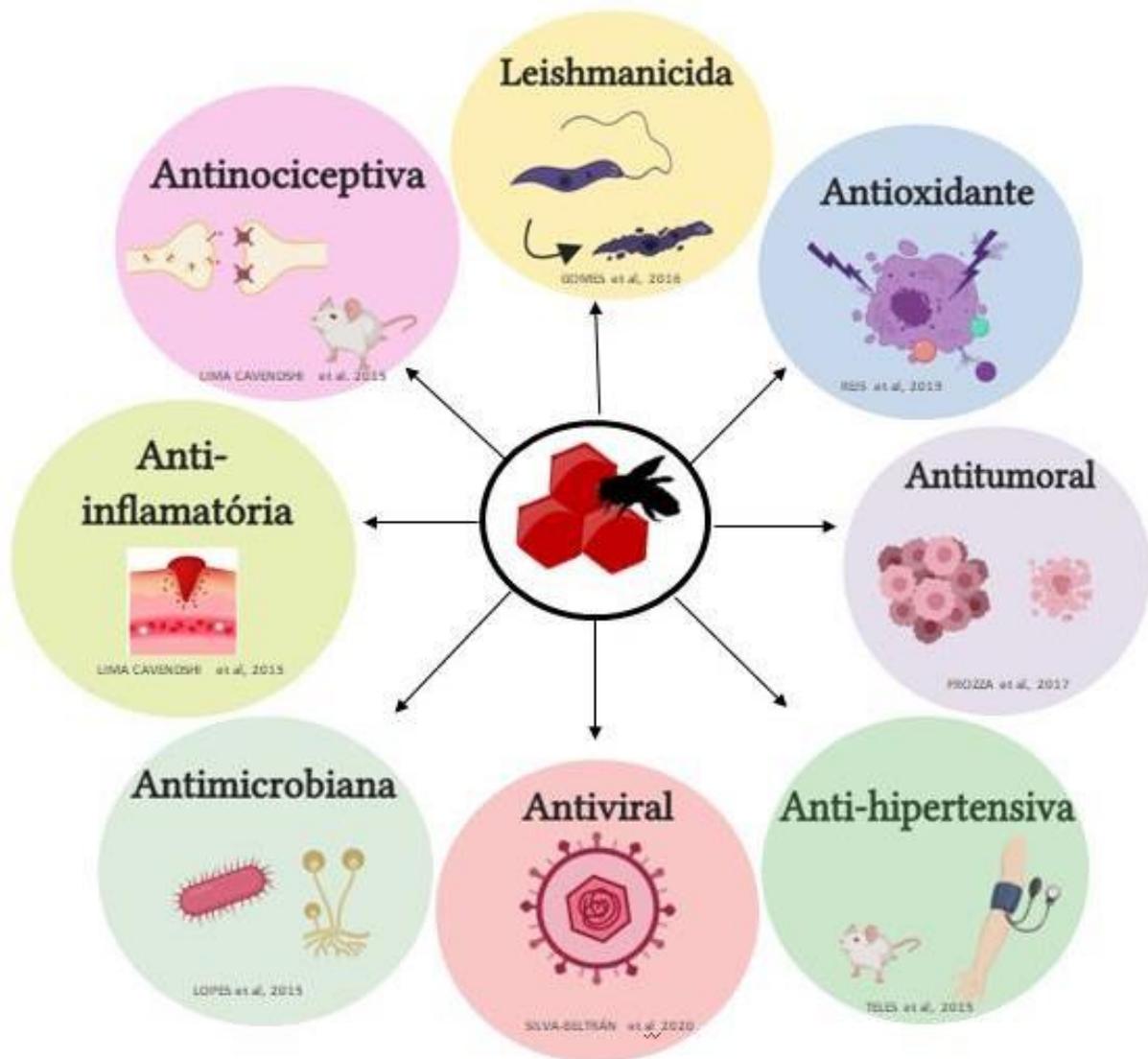
### 2.2.1 Própolis Vermelha de Alagoas

A própolis vermelha é uma resina natural resultante da coleta de exsudatos e brotos vegetais realizada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* em regiões costeiras e ribeirinhas do nordeste do Brasil e possui sua origem botânica a partir de uma leguminosa da espécie *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como “rabo de bugio”, responsável pela sua coloração vermelha (Figura 6), sendo classificada dentro do grupo 13 (Tabela 1).



**Figura 6. Abelhas da espécie *Apis mellifera* coletando o exsudato na leguminosa *Dalbergiaecastophyllum*.** Fonte: APACAME, 2019.

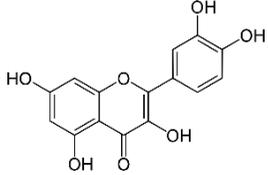
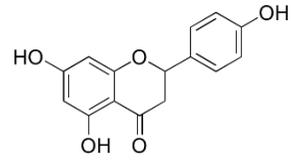
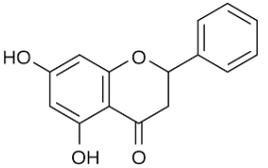
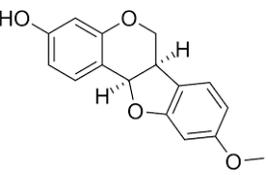
Recentemente, inúmeros estudos descreveram diversas atividades biológicas presentes nos extratos da própolis vermelha, tais como: antioxidante (FROZZA et al., 2017; REIS et al., 2019), antinociceptiva, anti-inflamatória (LIMA CAVENDISH et al., 2015), antimicrobiana (LOPEZ et al., 2015), leishmanicida (GOMES et al., 2016), anti-hipertensiva (TELES et al., 2015), antitumoral (FROZZA et al., 2017), e antiviral (SIMONI et al., 2018)(SILVA-BELTRÁN et al., 2020), conforme mostrado na figura 7.



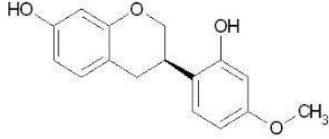
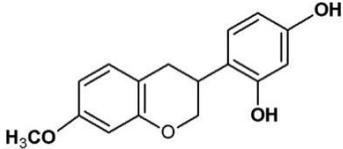
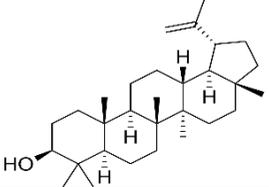
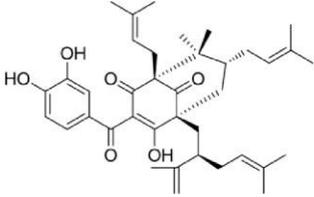
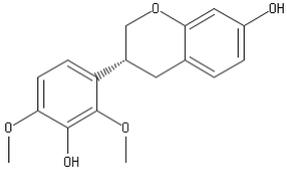
**Figura 7. Atividades biológicas da própolis vermelha**-Diversas propriedades biológicas presentes na própolis vermelha têm sido descritas na literatura.

Dentre os vários componentes presentes identificados na PVA destacam-se os flavonoides (quercetina e naringenina), chalconas (isoliquiritigenina), flavonas (liquiritigenina), flavononas (pinocembrina) e diversos isoflavonoides (medicarpina, daidzeína, formononetina, biochanina A, vestitol, neovestitol, mucronulatol), triterpenóides (lupeol), benzofenonas (gutiferona E), dentre outros (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016). Nos últimos anos, diversas atividades biológicas foram descritas para estas substâncias (Tabela 2).

**Tabela 2:** Compostos presentes na PVA e suas atividades biológicas.

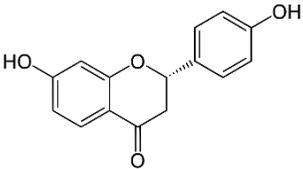
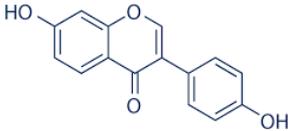
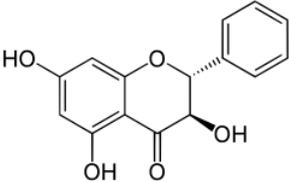
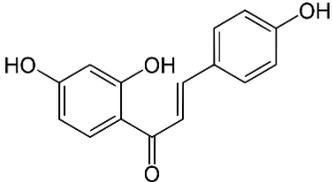
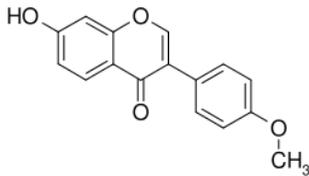
<b>Composto</b>	<b>Estrutura química</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referências</b>
<b>Quercetina</b>		Antimicrobiana, Anti-inflamatória, Antiviral <b>(vírus sincicial respiratório e Dengue 2 e 3)</b>	(JASSO-MIRANDA et al., 2019; LACZKO et al., 2019; LOPES et al., 2019; SHAH et al., 2019)
<b>Naringenina</b>		<b>Antiviral (ZIKV e CHIKV)</b> e antioxidante	(AHMADI et al., 2016; CATANEO et al., 2019; MD et al., 2019)
<b>Pinocembrina</b>		Antimicrobiana e <b>antiviral (ZIKV)</b>	(LEE et al 2019; METZNER; SCHNEIDEWIND, 1978)
<b>Medicarpina</b>		Anti-inflamatória e antifúngica	(FUNAKOSHI-TAGO et al., 2015; MARTÍNEZ-SOTRES et al., 2012)

---

<b><i>Vestitol</i></b>		Antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante	(BUENO-SILVA et al., 2013, 2017 <sup>a</sup> ; RIGHI et al., 2011)
<b><i>Neovestitol</i></b>		Antimicrobiana e anti-inflamatória	(BUENO-SILVA et al., 2013)
<b><i>Lupeol</i></b>		Antiviral (DENV e CHIKV)	(GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017)
<b><i>Gutiferona E</i></b>		Antibacteriana e antifúngica	(LOTTI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006)
<b><i>Mucronulatol</i></b>		Antiproliferativa	(PICCINELLI et al., 2011)

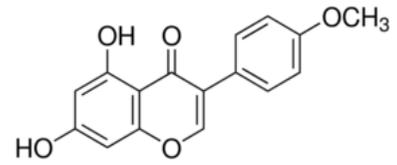
---

---

<b>Liquiritigenina</b>		Apoptose em células HeLa, anti- diabetes	(GAUR et al., 2014; HU et al., 2010; LIU et al., 2011)
<b>Daidzeína</b>		<b>Antiviral (Influenza, Hepatite B e DENV-2)</b> Pro- inflamatória	(CHUNG et al., 2015; COMALADA et al., 2006;; ZANDI et al., 2011)
<b>Pinobanksina</b>		-	-
<b>Isoliquiritigenina</b>		Anti-proliferativa em células MCF7, anti- inflamatória e anti-diabetes	(GAUR et al., 2014; MAGGIOLINI et al., 2002; ZHU et al., 2012)
<b>Formononetina</b>		<b>Antiviral (Enterovirus 71)</b> , antifúngica, anti- câncer e antitumoral (Hep-2)	(DAI et al., 2019; DAS NEVES et al., 2016; FROZZA et al., 2017; JIANG et al., 2019; YAO et al., 2019)

---

**Biochanina A**



**Antiviral (H5N1)**  
Antitumoral (Hep-2) antifúngica

(DAS NEVES et al., 2016; HSU et al., 2018;  
MICHAELIS; SITHISARN; CINATL, 2014)

---

Além disso, a PVA se destaca dentre todos os outros grupos de própolis devido ao seu alto teor de flavonoides (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016), que possuem atividades antivirais relatadas contra o vírus Influenza (CHUNG et al., 2015; MICHAELIS; SITHISARN; CINATL, 2014) vírus da hepatite B (ROMERO et al., 2005), vírus Dengue 2 e 3 (ZANDI et al., 2011), Enterovirus 71 (DAI et al., 2019), vírus sincicial respiratório humano/RSV (LOPES et al., 2019), vírus Zika (LEE et al., 2019), além de CHIKV (AHMADI et al., 2016; GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017). No entanto, vale ressaltar que a atividade antiviral da PVA contra o CHIKV ainda não foi relatada na literatura até o presente momento.

### **2.3 Potenciais alvos de ação de drogas antivirais**

Um dos objetivos principais no desenvolvimento de drogas antivirais promissoras, é que essas moléculas possam inibir eventos específicos da infecção viral sem que isso possa interferir no metabolismo da célula hospedeira. Para que isso ocorra, essas drogas precisam agir em uma das diferentes etapas de ciclo de replicação viral (SANTOS, 2015).

Os ensaios *in vitro* de pós-tratamento e inativação viral (virucida) tem como objetivo avaliar a atividade antiviral de substâncias que possam agir em diferentes etapas da replicação viral, tais como: a) inibir o desnudamento viral impedindo assim a liberação do material genético e sua transcrição (KAUR et al., 2013; ROTHAN et al., 2016); b) interferência na transcrição e tradução das proteínas virais; c) inibição da montagem e maturação da partícula viral dentro da célula; d) inibição da saída do vírus por brotamento da célula hospedeira; e) interação com proteínas do envelope ou capsídeo impedindo a interação do vírus com a membrana da célula hospedeira (DELOGU et al., 2011; KHAN et al., 2010; SANTOS, 2015).

Assim, tendo em vista o impacto da infecção pelo CHIKV como um problema mundial de saúde pública, a ausência de fármacos específicos disponíveis para seu tratamento e as propriedades da própolis vermelha, incluindo a antiviral, a hipótese deste estudo é que a PVA possa ter atividade biológica contra o CHIKV *in vitro*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Avaliar a atividade antiviral do extrato bruto hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas (PVA) e suas frações contra o vírus Chikungunya *in vitro*.

#### 3.2 Específicos

- Caracterizar quimicamente o extrato hidroalcoólico (EH) da própolis vermelha de Alagoas (PVA) e suas frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE) por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC);
- Realizar o isolamento do CHIKV a partir de amostras de soro de pacientes infectados no período de viremia;
- Determinar o título viral obtido a partir do ensaio de unidades formadoras de placas (PFU);
- Avaliar a toxicidade do EH da PVA e suas frações em células Vero E6 para determinação de  $CC_{50}$  e concentração máxima não tóxica (CMNT);
- Avaliar a atividade antiviral do EH da PVA e suas frações após a adsorção viral no ensaio de pós-tratamento;
- Avaliar a ação do EH da PVA e suas frações atuando diretamente sobre as partículas do CHIKV *in vitro*;
- Determinar a percentagem de células infectadas pelo CHIKV por meio de citometria de fluxo intracelular na presença ou ausência dos materiais teste;
- Avaliar a ação antiviral dos materiais teste adicionados em diferentes tempos de infecção viral;
- Realizar ensaios *in silico* de docking molecular dos principais constituintes detectados na PVA frente às proteínas estruturais e não-estruturais do CHIKV.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Células e manutenção

As células Vero E6 e C6/36 utilizadas neste trabalho são susceptíveis e permissíveis à infecção pelo CHIKV, ou seja, permitem a infecção e a replicação do vírus de forma eficiente.

As células Vero E6 são fibroblastos de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio DMEM *Low-Glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) para manutenção e expansão das células e 2% para os ensaios antivirais e 1% solução antibiótica/antimicótica (PSA).

As células C6/36 são células provenientes de larvas de mosquito da espécie *Aedes albopictus* e foram mantidas a 28 °C em meio L-15 suplementado com 10% de SBF e triptose e 1% PSA.

### 4.2 Isolamento viral e caracterização molecular do CHIKV

O CHIKV foi isolado a partir de amostras de soro obtidas de pacientes infectados (confirmado por PCR em tempo real) na fase virêmica gentilmente cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL) em um projeto anterior de nosso grupo de pesquisa (PPSUS 60030 000841/2016; Projeto submetido e aprovado junto ao CEP/UFAL C.A.A.E. 59229716.9.0000.5013). Resumidamente, 100 µL da amostra de soro foi inoculado a uma densidade de 5 x 10<sup>5</sup> células Vero E6/poço em uma placa de 6 poços por 72 horas ou até o aparecimento do efeito citopático viral (ECV), que são alterações morfológicas celulares microscópicas decorrentes da infecção viral, como por exemplo, a formação de sincícios. O sobrenadante foi coletado e o RNA viral foi extraído utilizando-se o kit Reliaprep Viral TNA Mini Prep (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante e o isolamento viral foi confirmado por RT-PCR usando iniciadores específicos para região codificante para proteína E1 “*forward*” (CAGCAGAGTGCAAGGACAAA) e “*reverse*” (CCGTCGAGAAAGAGATTTGC), sendo o produto gerado de 882 pares de base (pb). O produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose (2%) para análise.

Para análise filogenética e detecção do genótipo viral, o produto de PCR foi purificado a partir de uma RT-PCR realizada a partir do soro e enviado para

sequenciamento através do método de Sanger, na empresa especializada ACTGene Análises Moleculares (Alvorada-RS). Após o recebimento da sequência obtida, foi realizado um alinhamento da sequência nucleotídica da região amplificada com outras sequências de cepas representativas de todos os genótipos, isoladas no Brasil e no mundo, previamente depositadas no GenBank, através do software MEGA 7<sup>®</sup>. A análise filogenética foi realizada através do software MUSCLE, utilizando o algoritmo UPGMA, modelo Kimura-2, com *bootstrap* de 1000 repetições.

### 4.3 Obtenção do estoque viral e titulação do CHIKV

O estoque viral foi obtido em células C6/36. A adsorção viral foi realizada durante 2 horas na monocamada celular seguido de incubação durante 5 dias (JANG et al., 2016). Para obter os títulos virais, as monocamadas de células Vero E6 foram infectadas com diluições em duplicata do CHIKV com um fator de 1:10 por 2h. Após o período de adsorção, o sobrenadante foi removido seguido da adição do meio contendo 1% carboximetilcelulose (CMC) e 2% de meio DMEM low glicose SFB e 1% PSA para incubação por 48 h. Após o período de incubação, as células foram fixadas com formalina 10% por 1h e então coradas com solução de Cristal Violeta a 1%, por 30 min, seguido de lavagem com tampão fosfatado (PBS 1X) para contagem das placas e determinação do título viral (BAER; KEHN-HALL, 2014). O título viral foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Título (PFU/mL)} = \frac{\text{Média do nº de placas}}{\text{Volume do inóculo} \times \text{Diluição}}$$

### 4.4 Amostra de própolis vermelha de Alagoas (PVA)

A resina foi coletada no apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, sendo posteriormente macerada e solubilizada com 80% de etano e 20% de água, agitada e incubada por 48 h para a extração do extrato hidroalcoólico (EH). Após a coleta, o EH foi secado em rotoevaporador para obter um extrato bruto livre de solventes. Para obter as frações, o EH seco foi particionado em hexano e acetato de etila e colocados em um funil de separação e as frações devidamente separadas e secas posteriormente no rotoevaporador.

Os materiais testes utilizados neste estudo foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (ICF/UFAL). O extrato hidroalcoólico (EH), fração hexânica (FH) e fração acetato de etila (FAE) foram solubilizadas em DMSO para obter uma solução inicial. Posteriormente, foi realizada uma solubilização em meio DMEM *low*-glicose suplementado com 2% soro bovino fetal (SFB) para obtenção das concentrações a serem utilizadas nos ensaios.

#### **4.5 Caracterização química por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC-DAD)**

O EH, FH e FAE foram pesados (100 mg) solubilizados com etanol absoluto e transferidos para balão volumétrico de 10 mL para obter concentração de 10 mg/mL (solução estoque). Um volume de 500 uL foi transferido para balão volumétrico de 10 mL para obter concentração final de 500ug/mL (solução e trabalho). A solução foi transferida para vials HPLC e um volume de 2 uL foi injetado no UPLC-DAD.

A identificação dos marcadores da própolis vermelha nas tinturas foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (UPLC/DAD) (Shimadzu, Tóquio, Japão). As tinturas de própolis foram preparadas em uma concentração de 100 mg/mL usando etanol como solvente e depois diluído para uma concentração de 1,0 mg/mL.

A fase móvel consistiu em um sistema gradiente: 0,1% de ácido fórmico em água Milli- Q (A) e metanol grau HPLC (B). A separação foi obtida usando uma coluna C18 Phenomenex, equipada com uma coluna C18 phenomenex security guard e mantida a uma temperatura de 33°C. A taxa de fluxo foi de 0,80 mL/min.

O sistema gradiente foi programado para: 30% do solvente B no intervalo entre 0 e 7 min, 40% do solvente B em 15 min, 45% de solvente B em 30 min, 60% do solvente B em 40 min, 80% do solvente B em 50 min, 90% do solvente B em 60 min, e então o solvente B foi reduzido para 30% em 65 min e permaneceu nesta condição isocrática por 70 min. As amostras foram introduzidas no UPLC usando injetor Rheodyne com um volume de injeção de 20 µL.

#### **4.6 Ensaio de Citotoxicidade**

Para a realização dos testes antivirais foi realizado o ensaio de citotoxicidade dos materiais em células Vero E6 por meio do ensaio colorimétrico do MTT [3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] de acordo com protocolos determinados por seguindo modificação que foram propostas por (MOSMANN, 1983; SIEUWERTS et al., 1995). O MTT é um sal hidrossolúvel que por atividade mitocondrial é reduzido, formando cristais de sal de formazan em células viáveis. O formazan fica armazenado no citoplasma da célula viável que apresentam a coloração roxa onde é solubilizado pelo dimetilsulfóxido (DMSO).

Para realizar o ensaio de citotoxicidade, monocamadas confluentes de células Vero E6 em placas de 96 poços foram tratadas com diferentes concentrações dos materiais teste: EH = 400 a 3,125 µg / mL e frações FH e FAE = 10 a 0,31 µg / mL por 72h a 37°C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. A solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada (20 µl por poço) e incubada por 3 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 150 µl de DMSO seguido de incubação na estufa por 15 min. A absorbância de cada poço foi mensurada em um comprimento de onda de 492 nm em um espectrofotômetro.

As absorbâncias (Abs) das referidas triplicatas foram utilizadas para o cálculo das percentagens de viabilidade celular utilizando a fórmula:

$$\text{Viab. Cel. (\%)} = \frac{\text{Abs. da amostra} - \text{Média Abs. controle branco}}{\text{Média Abs. do controle celular} - \text{Média Abs. do controle branco}}$$

A concentração máxima não tóxica (CMNT) foi determinada para posterior utilização nos ensaios de avaliação da atividade antiviral.

A concentração que foi citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi obtida por meio de análise de regressão não-linear seguida por uma construção de uma curva sigmoideal dose-resposta variável no software GraphPad Prism 6.

#### **4.7 Ensaio de pós-tratamento**

As células Vero E6 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2 x 10<sup>4</sup>/poço. As monocamadas confluentes foram infectadas com o CHIKV por 2h para adsorção viral. Após o período de adsorção, as células foram lavadas com

tampão fosfato (PBS) e as monocamadas tratadas com diferentes concentrações de PVA ou suas frações sendo incubadas por 72 h a 37 °C e CO<sub>2</sub> a 5%, seguido da determinação da viabilidade celular pela metodologia de MTT. A percentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Inibição viral (\%)} = \frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Média Abs. Controle Viral}}{(\text{CV}) \text{Média Abs. Controle Celular} - \text{Média Abs. CV}}$$

As concentrações que inibiram 50% da ação viral (CI<sub>50</sub>) foram calculadas por regressão não-linear e construção de uma curva sigmoidal pela análise de curva log de inibição x resposta normalizada variável.

#### **4.8 Análise da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por marcação intracelular por citometria de fluxo**

Para confirmar a atividade antiviral células Vero E6 foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 2 x 10<sup>5</sup> células/poço e após a adsorção viral foram tratadas com o EH (100 µg/mL) ou suas frações FH e FAE (10 µg/mL) por 48 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de tratamento, o sobrenadante foi removido e as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando-se o kit BD *Cytofix/Cytoperm* (BD Biosciences) de acordo com recomendações do fabricante e submetidas à marcação intracelular utilizando-se um anticorpo monoclonal específico para o CHIKV (Invitrogen) seguido da incubação com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa Fluor 488 (Invitrogen). A aquisição das amostras foi realizada no equipamento BD FACS Canto II e os resultados foram analisados no software FlowJo.

#### **4.9 Ensaio de inativação viral**

Suspensões do CHIKV foram incubadas diretamente com o extrato hidroalcoólico (100µg/mL) e suas frações (10 µg/mL) a 37 °C por 2h. Após o período de incubação as suspensões foram diluídas em meio 2% SFB com o fator de diluição de 1:100 nas concentrações de 1 µg/mL (EH) e as frações (FAE ou FH) numa concentração de 0,1 µg/mL. As suspensões diluídas foram incubadas com células

Vero E6 a 37°C por 2h (AHMADI et al., 2016; OO et al., 2018). Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e foi adicionado o meio de manutenção e as células foram então incubadas por 72h seguido de avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT conforme descrito previamente.

Além disso, para o mesmo ensaio foi realizado o método de redução de unidades formadoras de placa (PFUs), onde após a adsorção por 2h, o sobrenadante foi retirado e em seguida foi adicionado 1mL de meio DMEM contendo 1% carboximetilcelulose (CMC) com 2% SFB e 1% PSA sendo mantido por 48h. Após este período, foram realizados os procedimentos para titulação viral conforme descrito no item 4.3.

#### **4.10 Ensaio de tempo de adição de droga**

Para avaliar em quais estágios do ciclo de replicação viral os materiais testados apresentaram atividade biológica monocamadas de células Vero E6 foram pré-tratadas com o EH (100 µg/ mL) ou suas frações (10 µg/ mL) por 2h antes da adsorção viral (-2h), simultaneamente (0h) ou em momentos diferentes após a adsorção viral (2, 4 e 6h) (AHMADI et al., 2016; OO et al., 2018). As viabilidades celulares foram avaliadas após 72h pelo ensaio de MTT conforme descrito previamente.

#### **4.11 Análise de docking molecular *in silico***

A interação “*in silico*” entre os compostos detectados na PVA com alvos moleculares do CHIKV foi avaliada em colaboração com o Prof. Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior do Laboratório de Química Medicinal (LQM/UFAL). Para isso, 6 alvos moleculares relevantes desse vírus foram obtidos em arquivos .pdb \* no RCSB Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org>): nsP2 (PDB: 3TRK), nsP2 / helicase (PDB: 6JIM), nsP3 (PDB: 3GPO), complexo da glicoproteína do envelope imatura (PDB: 3N40), complexo da glicoproteína do envelope madura (PDB: 3N41) e proteína do capsídeo (PDB: 5H23). Posteriormente, íons e moléculas de água de todos os PDBs foram removidos, usando a interface gráfica do Gold® versão 5.4.0 (Centro de Dados Cristalográficos de Cambrid - CCDC, <https://www.ccdc.cam.ac.uk>) (SILVA-JUNIOR et al., 2017), utilizado para realizar todas as simulações de acoplamento molecular. Além disso, todos os átomos de hidrogênio foram adicionados a todas as proteínas. Para

explorar a afinidade molecular entre essas substâncias naturais e os alvos moleculares do CHIKV, todas as simulações foram realizadas usando a abordagem de “blind docking molecular” como um método de pesquisa para avaliar o limite estérico das proteínas e interações de van der Waals e / ou ligações de hidrogênio entre os ligantes e o potencial local de ligação. Além disso, foi permitido que todos os doadores/aceptores de ligação H pudessem ser tratados como acessíveis a solventes. A função de pontuação de adequação do (CHEMPLP) foi empregada como algoritmo de pesquisa em todas as simulações de ancoragem usando o software Gold<sup>®</sup>. Após a obtenção dos complexos ligante-alvo, todas as interações foram analisadas usando o Auto Dock Tools<sup>®</sup> versão 1.5.6 (The Scripps Research Institute, <http://autodock.scripps.edu>). Finalmente, a versão 2.3.1 do PyMol<sup>®</sup> (Schrödinger, <https://pymol.org/2/>) foi usada para calcular todas as distâncias dos átomos e criar todas as ilustrações (DA SILVA-JUNIOR et al., 2018; “GO–D - Protein Ligand Docking Software - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)”).

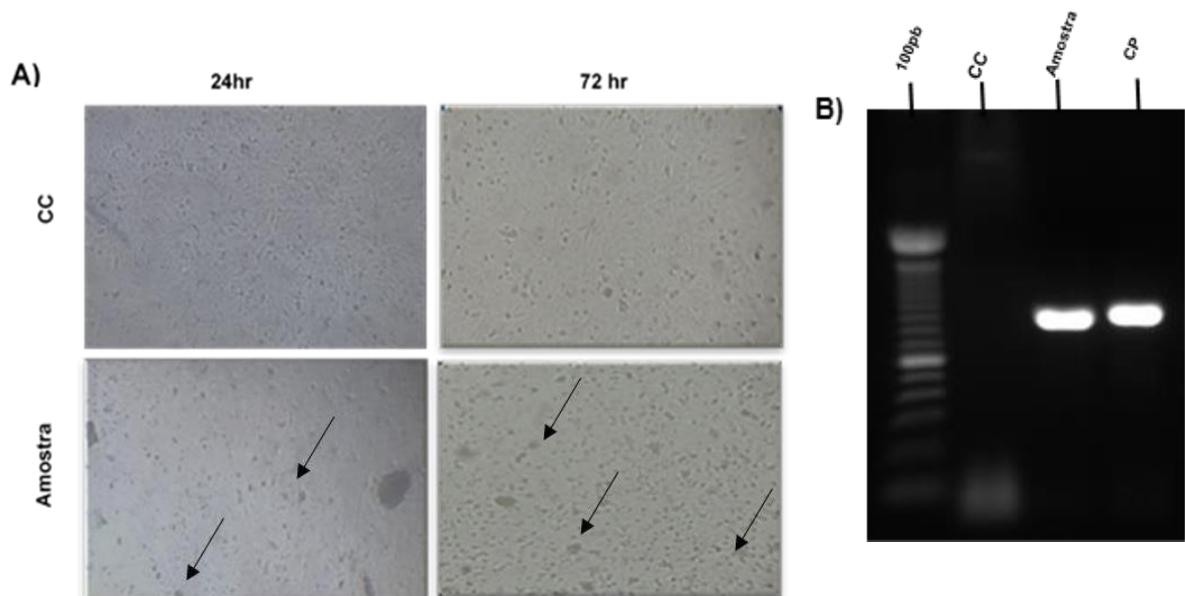
#### **4.12 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6 utilizando o teste one-way ANOVA com pós teste de Bonferroni e Dunnet's, dependendo das condições experimentais, sendo o  $p \leq 0,05$  considerado significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Isolamento e caracterização molecular do CHIKV

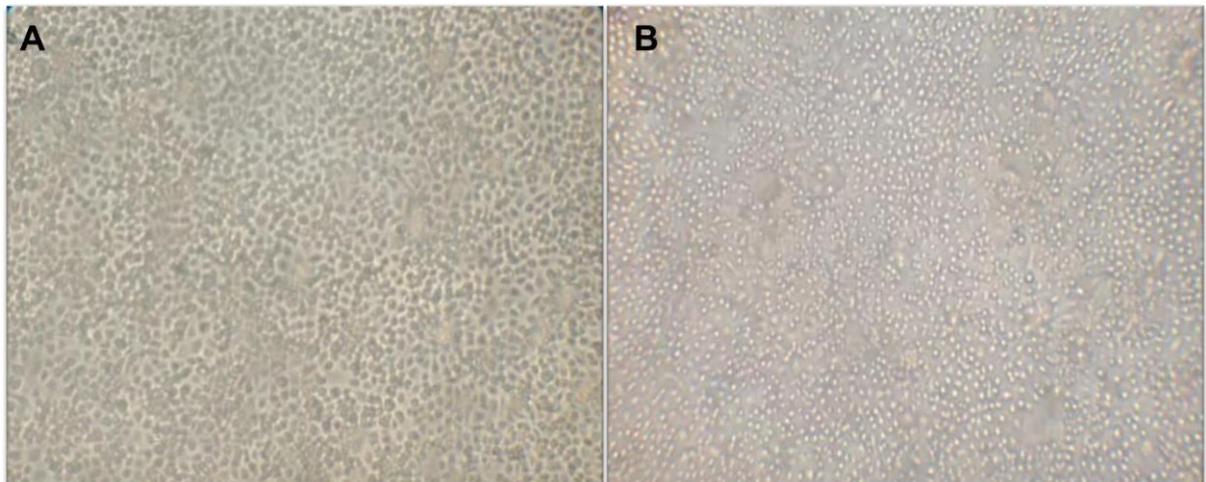
Inicialmente foi realizado o isolamento do vírus a partir de uma amostra de soro positiva confirmada por PCR em tempo real na fase virêmica. A amostra escolhida para o isolamento tinha um Ct baixo, sendo o procedimento realizado de acordo com o protocolo descrito previamente na literatura em células Vero E6 (JANG et al., 2016). Os efeitos citopáticos virais foram evidentes após 72 horas de infecção quando comparado ao controle celular negativo (Figura 8A). A confirmação do isolamento foi verificada pela detecção do genoma do CHIKV no sobrenadante de cultivo por RT-PCR, obtendo-se um amplicon de aproximadamente 882 pb (Figura 8B).



**Figura 8. Isolamento do vírus Chikungunya circulante em Alagoas-** (A) O efeito citopático (setas) foi evidenciado por microscopia óptica 24h e 48h após o isolamento em comparação ao controle celular (CC). Aumento de 63x. (B) RT-PCR utilizando- se primers específicos para a proteína o envelope E1 com geração de amplicon de aproximadamente 882pb. 100 bp – marcador de peso molecular; CC – sobrenadante coletado do controle celular negativo; Amostra – sobrenadante de cultivo celular coletado do isolamento viral; CP – controle positivo da reação/amostra positiva para CHIKV.

## 5.2 Propagação e titulação do CHIKV

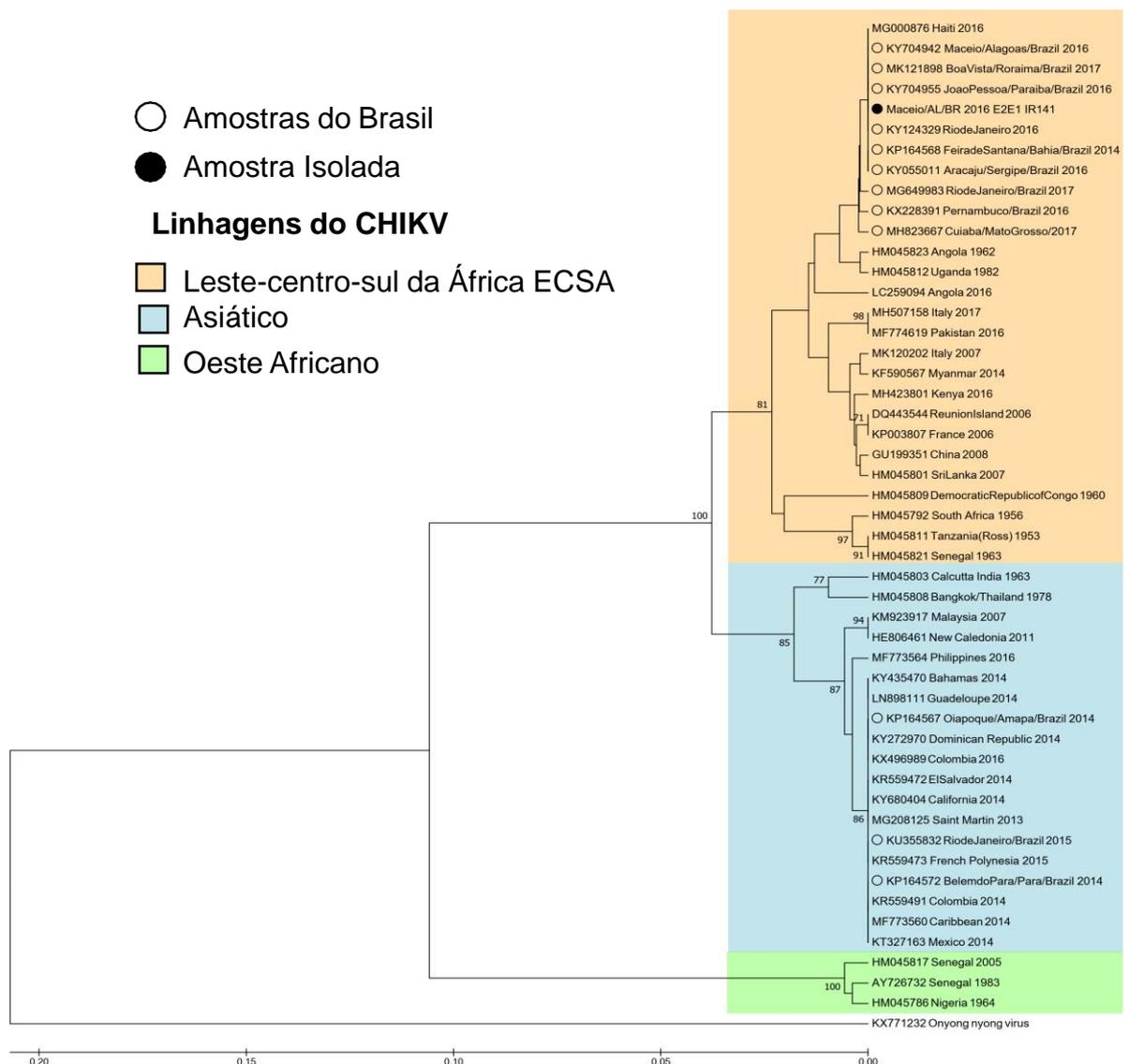
Após a confirmação do isolamento por RT-PCR o vírus foi propagado em células C6/36 por 5 dias, sendo observada uma alteração na refração nas células infectadas quando comparado ao controle negativo (Figura 9). Posteriormente, o vírus foi titulado em células Vero E6 obtendo-se um título de  $1,2 \times 10^7$  PFU/mL.



**Figura 9. Monocamadas de células C6/36 após 5 dias de infecção viral-** (A) Controle negativo após cinco dias de infecção. (B) O CHIKV demonstra efeito citopático moderado após cinco dias de infecção sendo verificado um aumento na refração celular. Aumento: 63x.

## 5.3 Análise filogenética viral

A amostra foi sequenciada e submetida a uma análise filogenética comparando a sequência obtida com diversas sequências do CHIKV reportadas no Brasil e no mundo para a região codificante de um trecho da proteína E2-E1 depositadas no GenBank. Neste estudo, detectou-se que a amostra de CHIKV isolada pertence ao genótipo ECSA, agrupando-se no mesmo clado que amostras reportadas em Sergipe e Bahia (Figura 10).

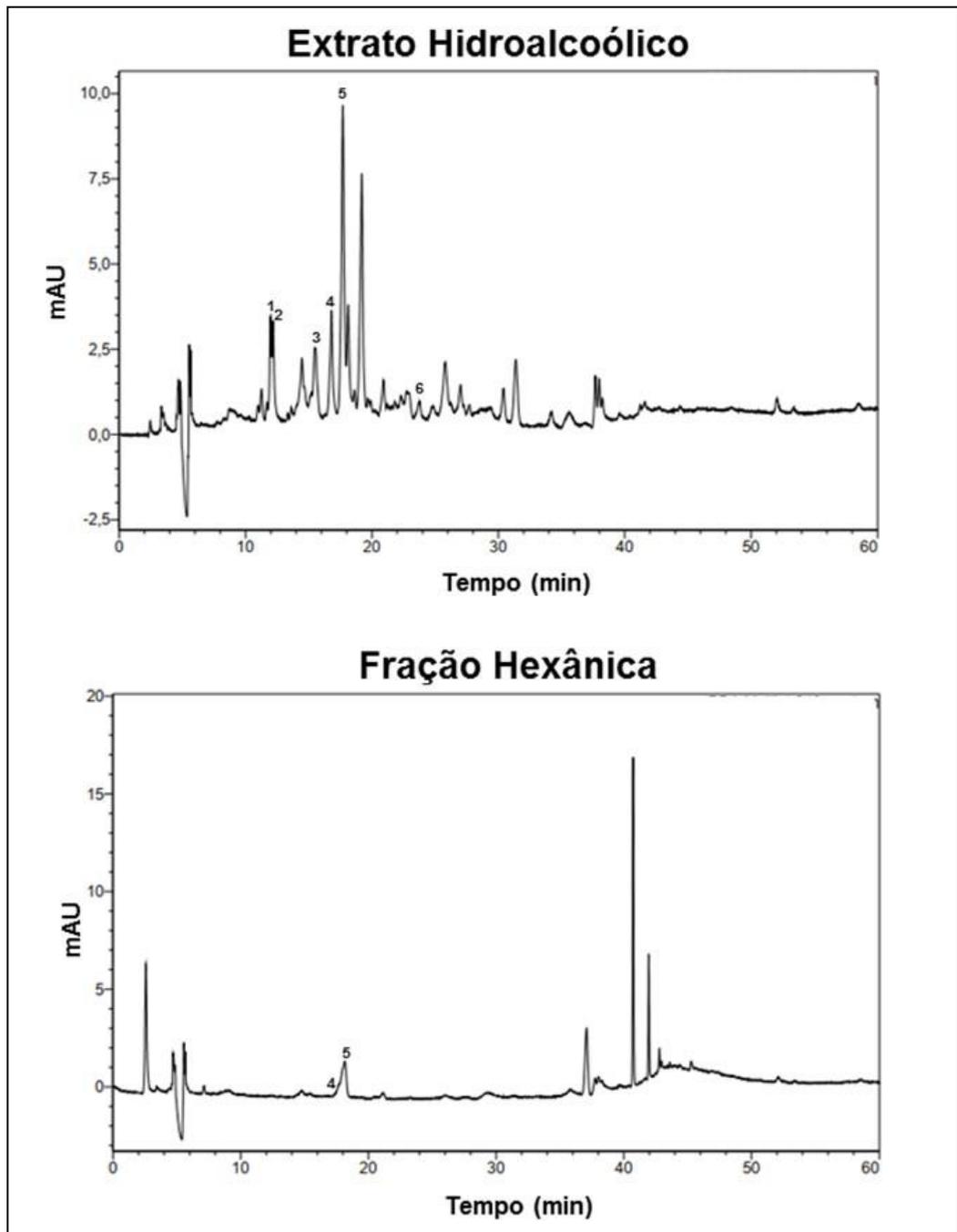


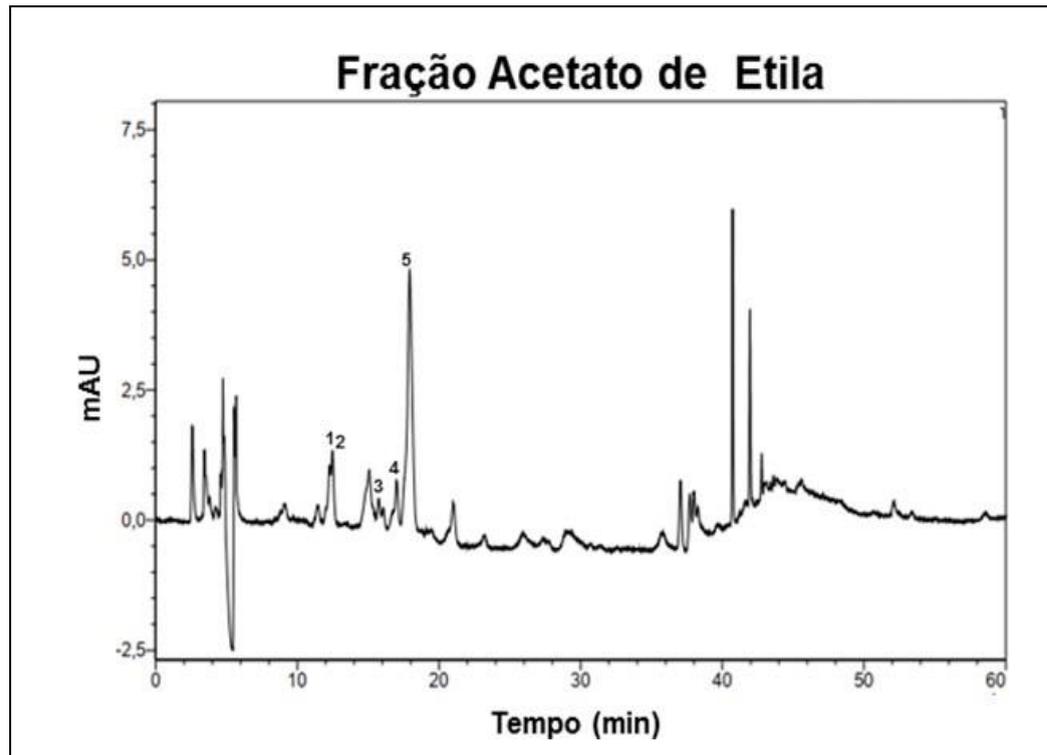
**Figura 10. Caracterização da amostra de Chikungunya circulante em Alagoas utilizada para isolamento viral-** Análise filogenética em comparação com amostras do CHIKV detectadas no Brasil e outros locais do mundo e depositadas no GenBank (NCBI).

#### 5.4 Caracterização química por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC-DAD)

A caracterização química do EH e frações FH e FAE da PVA foi realizada por meio de UPLC-DAD. Conforme mostrado na figura 11, diversos marcadores químicos foram detectados no EH destacando-se a liquiritigenina, daidzeina, formononetina, biochanina A e a isoliquiritigenina. As maiores concentrações foram detectadas para a liquiritigenina (5,91 µg/mL), isoliquiritigenina (6,16 µg/mL) e formononetina (6,62 µg/mL) (Tabela 3). Na FH foram detectados formononetina e isoliquiritigenina e na FAE

foram detectados todos os marcadores presentes no extrato hidroalcoólico, exceto a biochanina A (Figura 11 e Tabela 3).





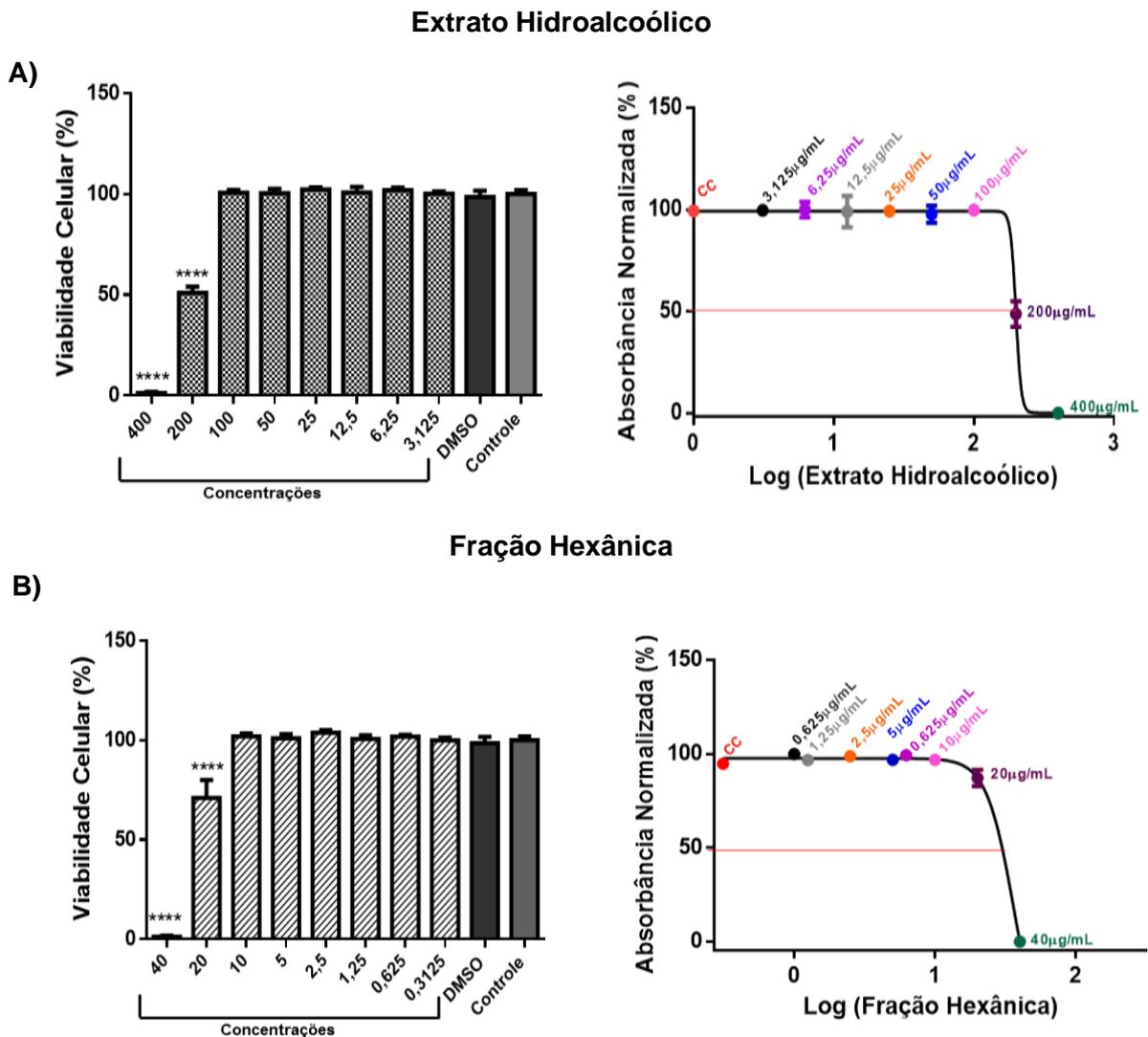
**Figura 11. Marcadores da Própolis Vermelha de Alagoas por UPLC -DAD-** Cromatogramas do extrato hidroalcoólico da PVA e suas frações hexânica e acetato de etila com uma concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Identificação de Liquiritigenina (1), Daidzeina (2), Pinobanksina (3), Isoliquitigenina (4), Formomentina (5), Biochanina A (6).

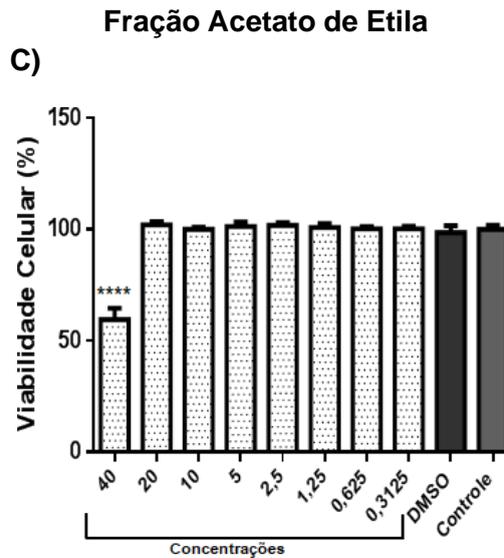
**Tabela 3:** Parâmetros cromatográficos: tempos de retenção (TR), comprimento de onda máximo e concentração do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Alagoas e suas frações.

Marcadores	TR (min)	$\lambda$ (nm)	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração (%)
<b><i>EH (500 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</i></b>				
1. Liquiritigenina	11.98	275	5,91	1,182
2. Daidzeina	12.18	249	2,247	0,449
3. Pinobanksina	15.17	291	0,915	0,183
4. Isoliquiritigenina	16.79	366	6,163	1,232
5. Formononetina	17.71	249	6,619	1,323
6. Biochanina A	2.375	245	0,209	0,041
<b><i>FH (500 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</i></b>				
1. Liquiritigenina	*	*	*	*
2. Daidzeina	*	*	*	*
3. Pinobanksina	*	*	*	*
4. Isoliquiritigenina	17.07	366	0,079	0,01
5. Formononetina	18.15	249	2,285	0,457
6. Biochanina A	*	*	*	*
<b><i>FAE (500 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</i></b>				
1. Liquiritigenina	12.27	275	3,35	0,67
2. Daidzeina	12.48	249	1,187	0,237
3. Pinobanksina	15.75	291	0,09	0,018
4. Isoliquiritigenina	17.00	366	2,282	0,564
5. Formononetina	17.93	249	5,616	1,123
6. Biochanina A	*	*	*	*

## 5.5 Ensaio de Citotoxicidade

Com relação a citotoxicidade dos materiais teste em células Vero E6 foi possível observar que a máxima concentração não tóxica (CMNT) foi de 100 µg/mL para o EH, 10 µg/mL para a FH e 20 µg/mL para a FAE (Figura 12). Por análise de regressão não-linear foi possível calcular os valores de  $CC_{50}$  obtendo-se o valor de 200,1 µg/mL para o EH e 22,57 µg/mL para a FH (Figura 12A e 12B). No caso da FAE a  $CC_{50}$  foi > 40 µg/mL (Figura 12C).

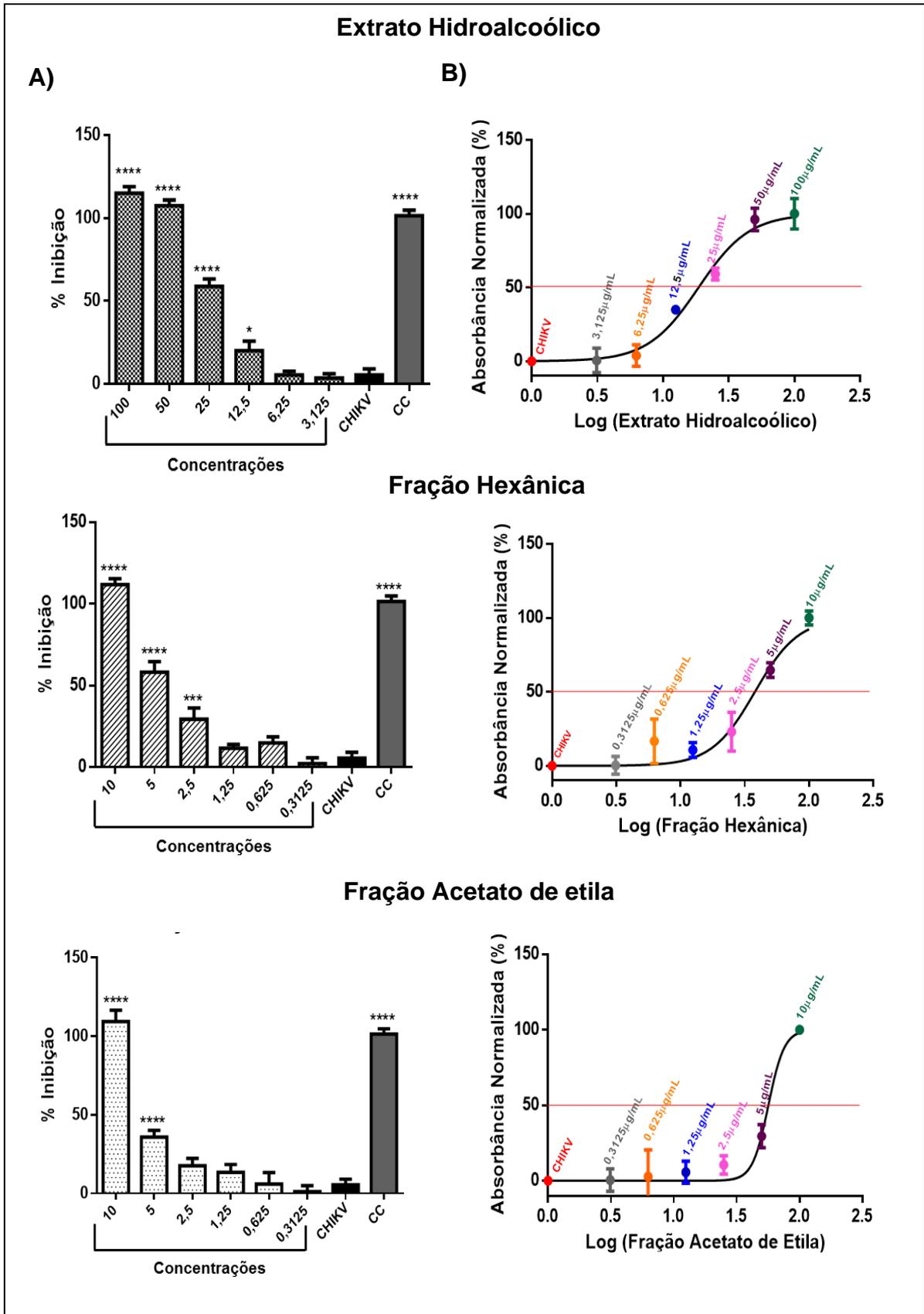




**Figura 12 . Ensaio de citotoxicidade da própolis vermelha de Alagoas e suas frações em células Vero E6 por 72 horas-** As células Vero E6 foram cultivadas em placas de 96 poços e tratadas com várias concentrações da própolis vermelha e suas frações por 72 horas, seguidas pela análise pela técnica de MTT. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA por múltiplas comparações (\*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao controle celular). Os valores mostrados são médias  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes em triplicata. Curva sigmoideal com valores de CC50 de dois experimentos independentes em triplicata (a direita). A) Extrato hidroalcoólico; B) Fração hexânica; C) Fração acetato de etila.

### 5.6 Ensaio de pós-tratamento

No ensaio de pós-tratamento os materiais testados demonstraram uma promissora atividade antiviral. O EH apresentou atividade antiviral significativa nas concentrações de 100 e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inibindo a ação viral próximo de 100% conforme mostrado na figura 13A. As frações FH e FAE inibiram a ação viral em 100% nas concentrações de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 13A). A partir dos valores das absorbâncias no ensaio de pós tratamento foram obtidos os valores de  $\text{CI}_{50}$  foi por meio de análise de regressão não-linear obtendo-se os valores de 22,80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o EH, 4,24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a FH e 5,34  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para FAE (Figura 13B).



**Figura 13. Avaliação da atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas e suas frações contra o vírus Chikungunya no ensaio de pós-tratamento-** A) A adsorção de CHIKV nas células Vero E6 foi realizada e seguida pelo tratamento com várias concentrações da própolis vermelha e suas frações por 72 h. A análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA com múltiplas comparações (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  em comparação ao controle CHIKV). Os valores mostrados são médias  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata. B) Curva sigmoidal com valores de  $CI_{50}$  de dois experimentos independentes em triplicata.

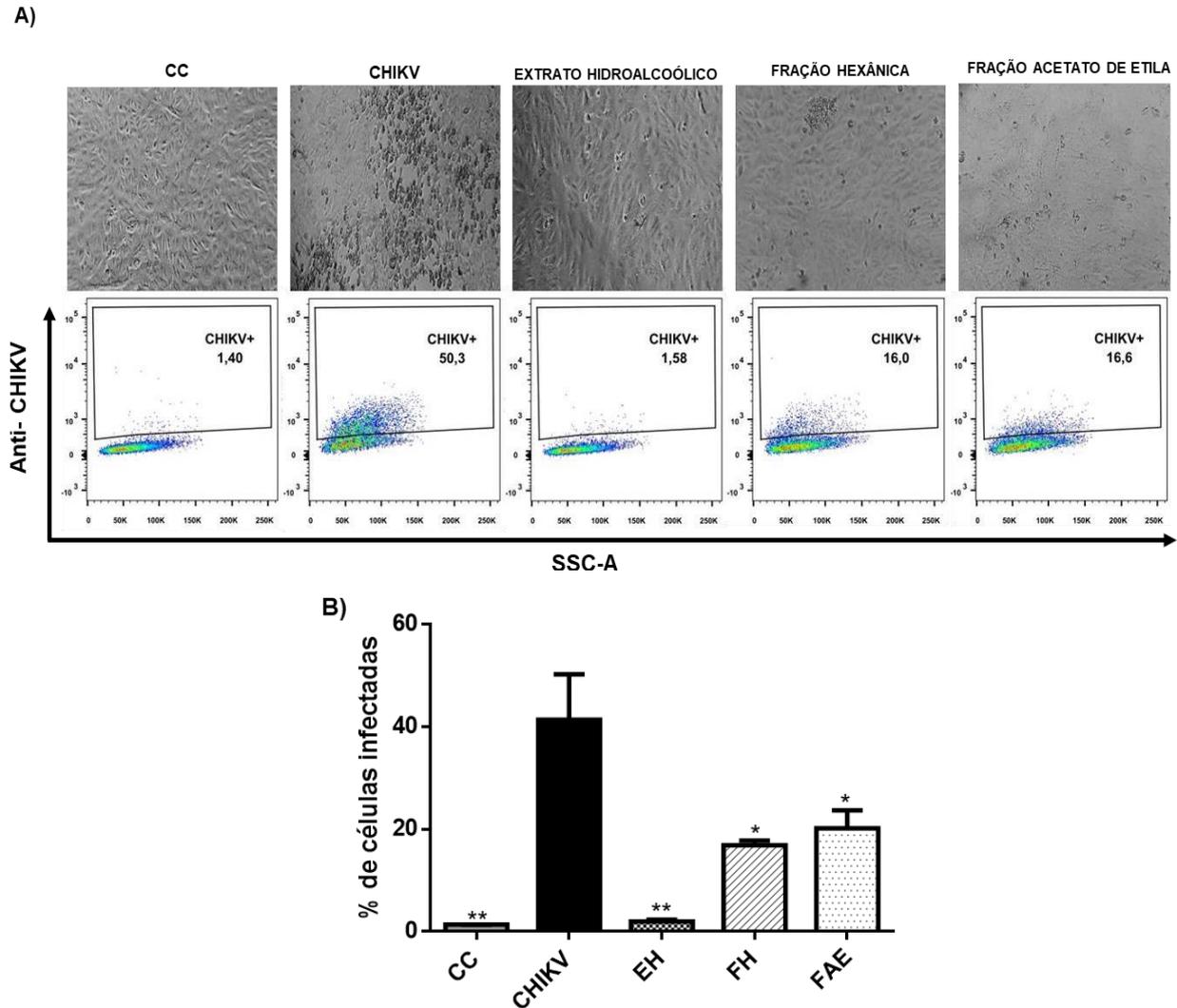
A partir dos valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foi possível calcular os índices de seletividade (IS) dos materiais testados no ensaio de pós tratamento obtendo-se os valores de 8,7 para o EH, 5,32 para a FH e  $> 7,49$  para FAE (Tabela 4).

**Tabela 4.** Valores de  $CC_{50}$ ,  $CI_{50}$  e IS do EH e frações FH e FAE no ensaio pós-tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes em triplicata.

<b>Ensaio de Pós tratamento</b>			
	<b><math>CC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>IS*</b>
<b><i>Extrato Hidroalcoólico</i></b>	200,1 $\pm$ 1,10	22,80 $\pm$ 2,09	8,7
<b><i>Fração Hexânica</i></b>	22,57 $\pm$ 0,14	4,24 $\pm$ 0,31	5,32
<b><i>Fração Acetato de Etila</i></b>	> 40	5,34 $\pm$ 0,16	>7,49

### **5.7 Análise da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por marcação intracelular por citometria de fluxo**

Para avaliação promissora atividade antiviral dos materiais teste contra o CHIKV foi realizada a determinação da percentagem de células infectadas por meio de análise por citometria de fluxo intracelular. Assim, detectou-se uma redução significativa na percentagem de células infectadas com o CHIKV após o tratamento com o EH e frações da PVA testados (Figura 14).

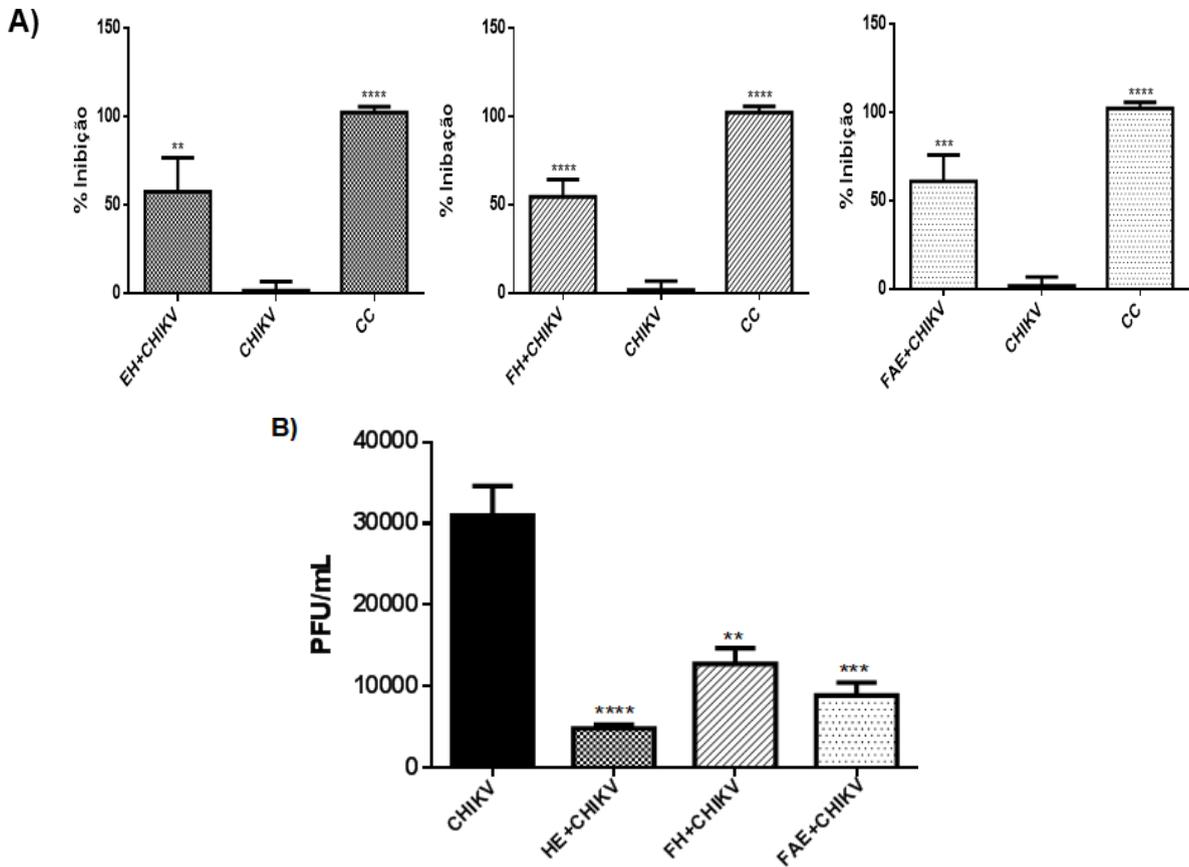


**Figura 14. Determinação da percentagem de células infectadas pelo CHIKV por citometria de fluxo intracelular-** A) Alterações morfológicas nas células Vero E6 evidenciadas por microscopia óptica foram observadas no aumento de 200X. Gráficos representativos da percentagem de células positivas para marcação intracelular do CHIKV (eixo Y) pela complexidade celular relativa (SSC) analisadas por citometria de fluxo. B) Média  $\pm$  SEM da percentagem de células infectadas pelo CHIKV detectadas por citometria de fluxo intracelular. A análise estatística foi realizada pelo método de ANOVA (\*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao controle CHIKV).

### 5.8 Inativação Viral

O ensaio de inativação viral inicialmente foi avaliado pela técnica de MTT utilizando-se as CMNT determinadas no ensaio de citotoxicidade. Conforme mostrado na figura 15, verificou-se uma inibição viral acima de 50% (Figura 15A) para o EH assim como para as frações FH e FAE. Para confirmação deste resultado a metodologia de redução de unidades formadoras de placa (PFU) foi então realizada. Como resultado, verificou-se uma redução significativa do número de placas formadas após o tratamento. O título viral foi então determinado onde detectou-se uma redução

significativa após o tratamento comparado ao controle viral não tratado (EH = 4.867 PFU/mL, FH= 12.767 PFU/mL e FAE = 8.867 PFU/ml vs. controle CHIKV não-tratado = 31.000 PFU/mL) conforme mostrado na figura 15B.

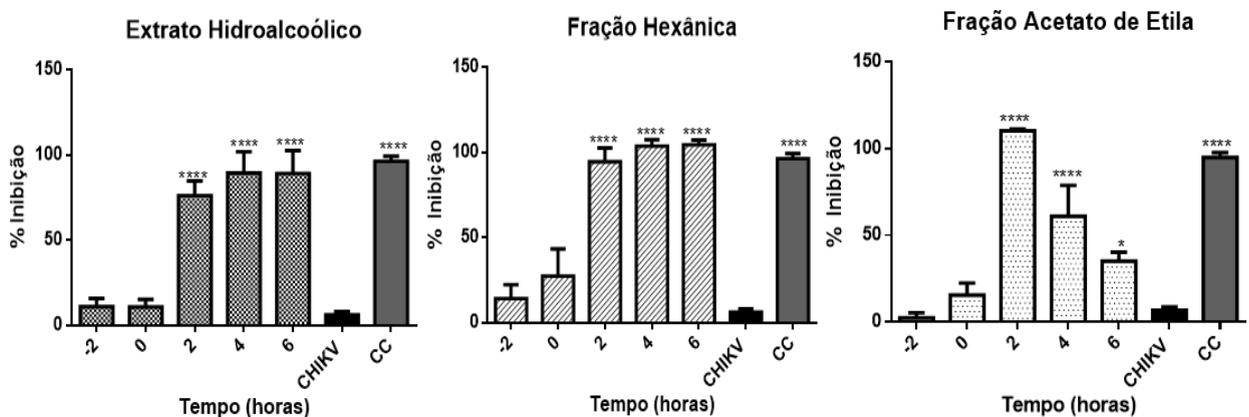


**Figura 15. Ensaio de inativação viral-** A) Suspensões do CHIKV foram incubadas diretamente com 100 µg/mL do EH da PVA e 10µg/mL das frações FH e FAE por 2h. Após a incubação, a mistura foi diluída na proporção de 1:100 para impedir a ação do composto no momento da adsorção viral. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT após 72 h. Os dados foram analisados usando o teste ANOVA com múltiplas comparações (\*\* p <0,01, \*\*\* p ≤ 0,001; \*\*\*\* p ≤ 0,0001 comparado ao controle CHIKV). B) Ensaio de inativação por ensaio de redução de placas (PFUs) (Média ± SEM do título viral obtido).

### 5.9 Ensaio do tempo de adição de droga

O ensaio de tempo de adição de droga foi realizado com o objetivo de observar em quais etapa da infecção viral os materiais testados no presente estudo poderiam apresentar atividade biológica. No tratamento com EH ou FH foi observada uma maior porcentagem de inibição em 2, 4 e 6 horas pós infecção viral (Figura 16). No entanto, uma maior inibição promovida pelo tratamento com a FAE foi observada em 2 e 4 horas pós infecção viral. Além disso, não foi observada uma inibição significativa

quando os compostos foram adicionados previamente (-2h) ou simultaneamente (0h) a infecção viral (Figura 16).

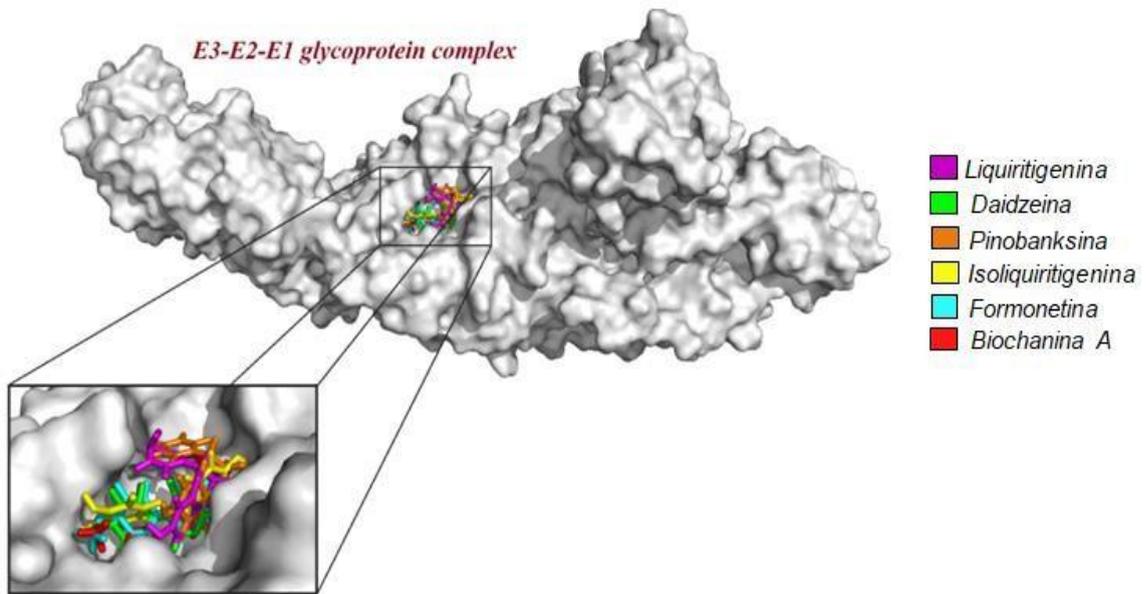


**Figura 16. Ensaio do tempo de adição de droga da atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas e suas frações contra CHIKV em células Vero E6 por 72 h-** As células Vero E6 foram tratadas com PVA por 2 horas antes da infecção com CHIKV (-2h), simultaneamente ao vírus/PVA + CHIKV (0h) ou em diferentes momentos após a infecção (2h, 4h e 6h). A viabilidade celular foi detectada após 72 horas pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de um experimento independente em triplicata pelo teste ANOVA com múltiplas comparações (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$  comparado ao controle CHIKV).

### 5.10 Análise de docking molecular *in silico*

Após a obtenção de resultados promissores nos ensaios antivirais para EH e suas frações, uma análise *in silico* de *docking* molecular foi realizada para os compostos: biochanina A, daidzeína, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina e pinobanksina frente a seis alvos moleculares do CHIKV: nsP2, nsP2 / helicase, nsP3, complexo de glicoproteínas E3-E2-E1 imaturo e maduro e a proteína C. Os resultados do Docking molecular revelaram que os compostos biochanina A, daidzeína, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, pinobanksin exibem alta afinidade para o complexo de glicoproteínas E3-E2-E1 do envelope, com valores FitScore de 63,6, 63,1, 63,9, 66,3, 47,6 e 56,1, respectivamente e estando alocadas no mesmo sítio de ligação (Figura 17).

Basicamente, foi observado que todos os compostos interagem com os aminoácidos Thr 510 e Phe 512, pertencentes no complexo de glicoproteínas E3-E2-E1 maduro, considerando ligação de pontes de hidrogênio interações hidrofóbicas. A biochanina A apresentou o maior número de interações entre os aminoácidos, enquanto a pinobanksina apresentou a menor interação (Tabela 5).



**Figura 17: Constituintes químicos da própolis vermelha com complexo glicoproteico E3-E2-E1 maduro-** A estrutura de destino é colorida em cinza (PDB:3N41), a fim de esclarecer possíveis locais de ligação na área superficial. Além disso, o sítio potencial de ligação é exibido em um quadrado de zoom. Finalmente, os ligantes são mostrados como bastões coloridos: liquiritigenina= rosa, daidzeína=verde, pinobanksina=laranja, isoliquiritigenina= amarelo, formononetina= azul e biochaninaA=vermelho.

**Tabela 5. Interações dos componentes em um potencial local de ligação complexo E3-E2-E1 do envelope viral.**

Interações		
Ligantes	Resíduos de aminoácidos	Pontes de hidrogênio
Liquiritigenina	Phe <sup>512</sup> , Ser <sup>514</sup> , Tyr <sup>516</sup> , Val <sup>73</sup>	Tre <sup>510</sup> , Fen <sup>512</sup>
Daidzeina	Leu <sup>436</sup> , Ser <sup>514</sup> , Tyr <sup>516</sup> , Val <sup>573</sup> , Lis <sup>575</sup> , Asn <sup>658</sup> , Thr <sup>660</sup>	Tre <sup>510</sup> , Fen <sup>512</sup>
Pinobanksina	Tyr <sup>574</sup> , Lis <sup>575</sup>	Tre <sup>510</sup> , Fen <sup>512</sup>
Isoliquiritigenina	Thr <sup>510</sup> , Val <sup>573</sup> , Asn <sup>658</sup> , Pro <sup>659</sup> , Val <sup>660</sup>	Fen <sup>512</sup> , Lis <sup>575</sup>
Formononetina	Leu <sup>436</sup> , Glu <sup>511</sup> , Tyr <sup>516</sup> , Val <sup>573</sup> , Lis <sup>575</sup> , Val <sup>660</sup> , Asn <sup>658</sup> , Pro <sup>659</sup>	Tre <sup>510</sup> , Fen <sup>512</sup>
Biochanina A	Leu <sup>436</sup> , Glu <sup>511</sup> , Tyr <sup>516</sup> , Val <sup>573</sup> , Lis <sup>576</sup> , Tre <sup>657</sup> , Asn <sup>658</sup> , Pro <sup>659</sup> , Val <sup>660</sup>	Tre <sup>510</sup> , Fen <sup>512</sup>

## 5 DISCUSSÃO

Apesar do isolamento e identificação do CHIKV ter ocorrido em 1953, esse arbovírus se tornou um problema de saúde pública ao redor do mundo devido à ausência de medicamentos antivirais e vacinas que possuam uma eficácia na sua prevenção e/ou tratamento. Nos últimos anos, estudos relataram diversos compostos antivirais eficazes contra o CHIKV *in vitro* (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; DA SILVA-JÚNIOR et al., 2017; OO et al., 2018), ressaltando a relevância de pesquisas para a descoberta de novos agentes farmacológicos contra este vírus.

No presente estudo, foi realizado o isolamento do CHIKV circulante em Alagoas, utilizando células Vero E6. O efeito citopático foi bastante evidente após 72h de infecção, em concordância com o estudo realizado por JANG et al., 2016, onde evidenciou-se morte, agrupamento de células e aumento de refringência celular. O genoma viral foi detectado no sobrenadante de cultivo celular confirmando o isolamento viral. Por meio do sequenciamento de um trecho do genoma codificante para uma região parcial das proteínas do envelope E2-E1 e posterior análise filogenética detectou-se o genótipo ECSA, sendo agrupado no mesmo clado das amostras virais reportadas no estado da Bahia em 2014 e Sergipe em 2016 (COSTA-DASILVA et al., 2017; NUNES et al., 2015). Além disso, este resultado corroborou com o estudo realizado previamente por (TANABE et al., 2018), onde o genótipo ECSA do CHIKV foi detectado em diversas amostras de pacientes infectados pelo vírus no surto de 2016 no estado de Alagoas.

A propagação do CHIKV para obtenção do estoque viral foi realizado em células C6/36, que são provenientes de larvas do mosquito *Aedes albopictus*. Nestas células, o efeito citopático observado foi moderado, consistindo apenas de aumento na refringência celular quando visualizado em microscopia óptica, conforme descrito previamente por LI et al., 2012.

Com relação a caracterização química da PVA e suas frações, no EH, foram detectados os marcadores liquiritigenina, daidzeina, formononetina, biochanina A e isoliquiritigenina. Diversos estudos demonstram que alguns fatores podem influenciar na presença ou ausência de compostos, bem como sua concentração, dentre estes fatores está a sazonalidade (SFORCIN et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2010). Em um estudo que avaliou os marcadores presentes na PVA, por cromatografia de ultra-performance (UPLC-DAD) estes marcadores também foram detectados (DO

NASCIMENTO et al., 2018). Com relação a FAE, foram detectados os marcadores liquiritigenina, daidzeína, formononetina, biochanina A e isoliquiritigenina sendo estes marcadores também detectados em um estudo prévio que caracterizou quimicamente esta fração da PVA (PORTO et al., 2018). Até o momento não há dados na literatura que caracterizaram quimicamente a FH, sendo este o primeiro estudo a fazer tal caracterização. É interessante notar que na FH só foram detectados a isoliquiritigenina e formononetina, em percentual menor do que a FAE e EH. Este dado sugere que o hexano não pode ser considerado um bom solvente para o isolamento de tais moléculas presentes na PVA.

Neste estudo, os componentes detectados em maior concentração na PVA foram a formononetina, isoliquiritigenina e liquiritigenina. Estes analitos também foram relatados no estudo de BUENO-SILVA et al., 2017, que avaliou a própolis do estado de Alagoas, exceto a liquiritigenina, que não estava em elevada concentração na amostra analisada. Esta divergência na PVA pode estar relacionada a diversos fatores, como por exemplo, a sazonalidade (BUENO-SILVA et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2010).

Diversas atividades antivirais dos constituintes detectados na PVA deste estudo foram descritas previamente na literatura, destacando-se da daidzeína contra o vírus Influenza, vírus da hepatite B e vírus Dengue tipo 2 (CHUNG et al., 2015; ROMERO et al., 2005; ZANDI et al., 2011), da formononetina contra o Enterovírus 71 (DAI et al., 2019) e da biochanina A contra o vírus Influenza (MICHAELIS; SITHISARN; CINATL, 2014; SITHISARN et al., 2013). No entanto, a atividade desses compostos e da PVA contra o CHIKV ainda não foi relatada na literatura até o presente momento. Assim, neste estudo foi investigada a atividade antiviral da PVA e suas frações FH e FAE em ensaios *in vitro* em células Vero E6 infectadas com o CHIKV.

Inicialmente, a citotoxicidade dos materiais teste foi avaliada para determinação da concentração a ser utilizada nos ensaios e para posterior cálculo do índice de seletividade. O ensaio de citotoxicidade mostrou que as CMNTs foram 100 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL para o EH, FAE e FH, respectivamente. Em outro estudo, a concentração máxima não tóxica do extrato da PVA foi 21,75 µg/mL, demonstrando assim que o extrato da própolis vermelha utilizada no nosso estudo foi possivelmente mais tolerado por células Vero E6 (RUFATTO et al., 2018). Com relação aos valores de CC<sub>50</sub>, o valor de 200,1 µg/mL foi obtido para o EH. No estudo realizado por GONZÁLEZ-BÚRQUEZ et al., 2018, que avaliou a atividade antiviral do extrato

etanólico da própolis mexicana contra o vírus da cinomose canina, uma  $CC_{50}$  de 750  $\mu\text{g/mL}$  em células vero E6 foi verificada, sugerindo que a própolis mexicana é mais tolerada que a PVA. Com relação as frações, não foi possível comparar os valores de  $CC_{50}$ , pois ambas não foram ainda avaliadas em outros estudos.

No ensaio de pós-tratamento, todos os materiais testados demonstraram uma inibição viral significativa contra o CHIKV nas maiores concentrações avaliadas. Em um estudo prévio, foi mostrado que o extrato hidroalcoólico da PVA, coletada no município de Maceió, promoveu a inibição viral em 97,8% contra o vírus herpes suíno e 95,8% contra o vírus herpes bovino em células Vero E6, na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  (SIMONI et al., 2018). No presente estudo, uma inibição de 100% contra o CHIKV, nas concentrações 100  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$  para o EH da PVA foi verificada *in vitro*. Para as frações FH e FAE não foram encontrados na literatura estudos que avaliem a sua atividade antiviral até o momento, embora uma atividade da fração hexânica antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* tenha sido relatada (RUFATTO et al., 2018).

O índice de seletividade avalia quão promissora é uma substância antiviral exercendo a sua atividade biológica e não promovendo citotoxicidade. Neste estudo, foram observados índices de seletividade superiores a 4 (tabela 4) tanto para o EH quanto para suas frações FH e FAE, o que demonstra a promissora atividade antiviral destes compostos. Em um estudo prévio de KUJUMGIEV et al., 1999, onde se avaliou a atividade antiviral de diferentes própolis de diversas regiões do Brasil (Paraná, Ceará e São Paulo) contra o vírus Influenza, índices de seletividade entre 2 e 4 foram obtidos. Assim, no presente estudo, os valores de IS mostraram quão promissora é a atividade antiviral da PVA contra o CHIKV.

A atividade antiviral foi confirmada por citometria de fluxo intracelular onde uma redução significativa na porcentagem de células Vero E6 infectadas com o CHIKV 48 h após a infecção foi detectada. Previamente, flavonoides isolados da própolis vermelha, como a naringenina, demonstraram uma redução da porcentagem de células de hepatocarcinoma (Huh 7.5) infectadas com o vírus Dengue tipo 1 após 72h (FRABASILE et al., 2017).

No ensaio de inativação viral, com o intuito de observar se os compostos utilizados teriam ação sob o vírus diretamente, impedindo a infecção posterior de células Vero E6, uma inibição significativa foi verificada para o EH, FH e FAE, onde

uma redução do número de PFUs do CHIKV foi detectada. Em estudos prévios, a incubação dos vírus HSV-1 e 2 com os extratos aquoso e etanólico da própolis por 2h previamente a infecção, mostraram uma redução nas PFUs, evidenciando assim uma inativação viral contra vírus envelopados (NOLKEMPER et al., 2010; SCHNITZLER et al., 2010).

Para determinar em quais etapas da infecção do CHIKV os materiais testados exercem sua ação antiviral, foi realizado o ensaio do tempo de adição de droga, onde a atividade biológica foi verificada principalmente nos tempos 2 a 4 h pós infecção. No entanto, não se observou atividade antiviral quando o tratamento foi realizado nos tempos -2h e simultaneamente (0h) a infecção viral. Em um estudo que avaliou a atividade antiviral da isoflavona biochanina A, que está presente na própolis vermelha do nosso estudo, foi verificada uma redução no título do vírus H5N1 em células A549, que são células de adenocarcinoma alveolar, quando o tratamento foi realizado em até 2h pós-infecção viral (SITHISARN et al., 2013).

O *docking* molecular usa algoritmos que muitas vezes podem prever as interações de um ligante ligado a um alvo potencial com precisão (VISWANATHAN et al., 2014). Com atividades tão promissoras sendo observadas no ensaio de pós tratamento e inativação viral e após identificação e quantificação dos componentes presentes na PVA, foi então realizada uma análise preliminar de *docking* molecular *in silico* para determinar possíveis alvos moleculares do CHIKV que possam interagir com os principais marcadores encontrados: liquiritigenina, daidzeina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina e biochanina A (BARROS, 2015).

Dos seis virais analisados por *docking* molecular, foi observado que os compostos naturais analisados demonstraram altas afinidades para o complexo de glicoproteínas maduras envelopadas (E3-E2-E1) (VOSS et al., 2010). A glicoproteína E1 é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana do hospedeiro, pois possui uma alça de fusão hidrofóbica, enquanto a proteína E2 é responsável por se ligar ao receptor do hospedeiro e proteger o *loop* de fusão em pH neutro (VOSS et al., 2010). Dessa maneira, considerando as interações *in silico* da liquiritigenina, daidzeina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina e biochanina A com resíduos de aminoácidos das proteínas do envelope do CHIKV, sugere-se que essas interações possam interferir na entrada do vírus na célula e/ou na produção de novos vírions. Os valores de Fitscore sugerem que essas moléculas possuem excelente afinidade com as proteínas do envelope do CHIKV, que podem atuar sobre a

superfície das partículas virais no momento da adesão do vírus nas células susceptíveis do hospedeiro (atuando como inibidores de entrada) e/ou antes mesmo da ligação à célula do hospedeiro (virucidas/inativação viral). Estes resultados *in silico* corroboram com os resultados experimentais obtidos sugerindo que a atividade inibitória da PVA e suas frações apresentam ação nas fases iniciais do ciclo de replicação viral, agindo provavelmente de forma simultânea, sobre as proteínas do envelope da partícula viral. Estudos futuros serão realizados para elucidação das substâncias presentes na PVA com ação biológica contra o CHIKV assim como o mecanismo antiviral molecular envolvido contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para esta arbovirose.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível isolarmos o CHIKV pertencente ao genótipo circulante no estado de Alagoas no surto de 2016 para que fosse possível a realização dos ensaios antivirais. Através do ensaio de citotoxicidade foi possível obter o valor de  $CC_{50}$  da PVA e suas frações além de suas máximas concentrações não tóxicas em células de primatas não-humanos (Vero E6).

No ensaio antiviral de pós-tratamento observou-se uma inibição viral muito promissora onde as soluções inibiram a ação do vírus em células Vero E6 por completo nas máximas concentrações testadas.

O tratamento com os compostos reduziu a percentagem de células infectadas, inibindo assim a infecção viral *in vitro*.

Os compostos tiveram a capacidade de inativação viral quando incubados diretamente com o CHIKV previamente a infecção viral, sendo que o título viral (PFUs/mL) foi reduzido significativamente após 48h de infecção.

No ensaio de tempo de adição de droga foi confirmada a atividade dos compostos quando as células são infectadas e tratadas de 2 a 6 horas pós infecção sugerindo uma atividade diretamente na partícula viral e/ou na replicação do vírus cujo mecanismo ainda precisa ser elucidado futuramente.

Com análises *in silico* por docking molecular foi possível observar que os constituintes detectados na PVA interagem com o complexo de glicoproteínas do envelope viral, corroborando com os resultados experimentais. Assim, experimentos posteriores serão realizados para avaliação da atividade antiviral contra o CHIKV dessas moléculas isoladamente.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a promissora atividade antiviral da PVA contra o CHIKV *in vitro*, contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes com atividade biológica para o tratamento desta arbovirose.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, 2015.
- AHMADI, A. et al. Inhibition of chikungunya virus replication by hesperetin and naringenin. **RSC Advances**, v. 6, n. 73, p. 69421–69430, 2016.
- AHMED, R. et al. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- APACAME - Mensagem Doce 110 - Artigo.
- ATHIKOMKULCHAI, S. et al. Chemical constituents of Thai propolis. **Fitoterapia**, v. 88, p. 96–100, 2013.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **Journal of Visualized Experiments**, n. 93, p. 1–10, nov. 2014.
- BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3–15, jan. 2000.
- BARROS. Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4. 2015.
- BARTH, O. M.; DA LUZ, C. F. P. Palynological analysis of Brazilian red propolis samples. **Journal of Apicultural Research**, v. 48, n. 3, p. 181–188, jan. 2009.
- BHAKAT, S.; SOLIMAN, M. E. S. Chikungunya virus (CHIKV) inhibitors from natural sources: A medicinal chemistry perspective. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 4, p. 451–462, 2015.
- BRASIL. **Manejo Clínico- Ministério da Saúde**. [s.l: s.n.].
- BRASIL, M. DA S. Boletim epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 48, n. Tabela 2, p. 13, 2017b.
- BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde**, v. 49, n. Tabela 1, p. 1–14, 2018.
- BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.
- BUENO-SILVA, B. et al. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017a.
- BUENO-SILVA, B. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 100–107, jul. 2017b.
- BÚFALO, M. C. et al. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1669–1680, 2009.

- CATANEO, A. H. D. et al. The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 16348, dez. 2019.
- CDC. Countries and territories where chikungunya cases have been reported. 2019.
- CHARLYS DA COSTA, A. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 10, p. 1742–1744, 2017.
- CHAUDHURI, S.; SYMONS, J. A.; DEVAL, J. Innovation and trends in the development and approval of antiviral medicines: 1987–2017 and beyond. **Antiviral Research**, v. 155, n. March, p. 76–88, 2018.
- CHUNG, S. T. et al. Novel daidzein analogs and their in vitro anti-influenza activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, n. 4, p. 685–696, 2015.
- COMALADA, M. et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1010–1021, 2006.
- COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005630, jun. 2017.
- DA SILVA-JUNIOR, E. F. et al. Molecular Docking Studies Applied to a Dataset of Cruzain Inhibitors. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 14, n. 1, p. 68–78, mar. 2018.
- DA SILVA-JÚNIOR, E. F. et al. **The medicinal chemistry of Chikungunya virus** *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2017.
- DA SILVA FROZZA, C. O. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137–142, fev. 2013.
- DAI, W. et al. Antiviral efficacy of flavonoids against enterovirus 71 infection in vitro and in newborn mice. **Viruses**, v. 11, n. 7, 2019.
- DAS NEVES, M. V. M. et al. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 159–166, jan. 2016.
- DAUGSCH, A.A; MORAES, C.S.A; FORT, P.A; PACHECO, E.; LIMA, I.B.B; ABREU, J.A.C; PARK, Y. K. . **Própolis Vermelha e sua origem botânica**.
- DE CLERCQ, E. Highlights in the Development of New Antiviral Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 163–175, 2005.
- DHIMAL, M. et al. Risk Factors for the Presence of Chikungunya and Dengue Vectors (*Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*), Their Altitudinal Distribution and Climatic Determinants of Their Abundance in Central Nepal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–20, 2015.
- DO NASCIMENTO, T. G. et al. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of some commercial extract of propolis. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 2, p. 246–254, 2018.

ERASMUS, J. H. et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. **Nature Medicine**, v. 23, n. 2, p. 192–199, fev. 2017.

FRABASILE, S. et al. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. **A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016.

FROZZA, C. O. DA S. et al. Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 951–963, jul. 2017.

FUNAKOSHI-TAGO, M. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 189–198, 2015.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171–178, jan. 2006.

GAUR, R. et al. In vivo anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 415–422, 2014.

GEKKER, G. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 158–163, 2005.

GOLD - Protein Ligand Docking Software - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).

GÓMEZ-CALDERÓN, C. et al. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of *Mammea americana* and *Tabernaemontana cymosa* on Dengue and Chikungunya virus infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, jan. 2017.

GONZÁLEZ-BÚRQUEZ, M. D. J. et al. Comparison between in Vitro Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, 2018.

HSU, Y. N. et al. Anti-proliferative activity of biochanin A in human osteosarcoma cells via mitochondrial-involved apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, n. December 2017, p. 194–204, 2018.

HU, K. et al. Synthesis and antitumoractivity of liquiritigenin thiosemicarbazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3453–3458, 2010.

JANG, J. et al. **Chikungunya Virus Methods and Protocols - Methods in Molecular Biology 1426**. [s.l: s.n.].

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 412–427, set. 2003.

JASSO-MIRANDA, C. et al. Antiviral and immunomodulatory effects of polyphenols on macrophages infected with dengue virus serotypes 2 and 3 enhanced or not with antibodies. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 1833–1852, 2019.

JIANG, D. et al. Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of

Formononetin. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

LACZKO, R. et al. Anti-inflammatory activities of *Waltheria indica* extracts by modulating expression of IL-1B, TNF- $\alpha$ , TNFRII and NF- $\kappa$ B in human macrophages. **Inflammopharmacology**, 2019.

LEE, J. LE et al. Antiviral activity of pinocembrin against Zika virus replication. **Antiviral Research**, v. 167, p. 13–24, jul. 2019.

LI, Y. G. et al. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirology**, 2012.

LIMA, R. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 127–133, 2015.

LIU, C. et al. Liquiritigenin induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome c release and caspases activation in heLa cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 277–283, 2011.

LOPES, B. R. P. et al. Quercetin pentaacetate inhibits in Vitro Human Respiratory Syncytial Virus adhesion. **Virus Research**, p. 197805, nov. 2019.

LOTTI, C. et al. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr5p by a natural compound extracted from Brazilian Red Propolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 5, p. 901–907, 2011.

MAGGIOLINI, M. et al. Estrogenic and antiproliferative activities of isoliquiritigenin in MCF7 breast cancer cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 82, n. 4–5, p. 315–322, 2002.

MARTÍNEZ-SOTRES, C. et al. Medicarpin, an antifungal compound identified in hexane extract of *Dalbergia congestiflora* Pittier heartwood. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 69, p. 38–40, abr. 2012.

MD, S. et al. Neuroprotective and antioxidant effect of naringenin-loaded nanoparticles for nose-to-brain delivery. **Brain Sciences**, v. 9, n. 10, out. 2019.

**MENDONÇA, L. S.** Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha.

METZNER, J.; SCHNEIDEWIND, E. M. [Effect of pinocembrin on the course of experimental candida infections in mice]. **Mykosen**, v. 21, n. 8, p. 257–62, ago. 1978.

MICHAELIS, M.; SITHISARN, P.; CINATL, J. Effects of flavonoid-induced oxidative stress on anti-H5N1 influenza a virus activity exerted by baicalein and biochanin A. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2014.

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

- NAVECA, F. G. et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007065, mar. 2019.
- NOLKEMPER, S. et al. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 132–138, 2010.
- NSOESIE, E. O. et al. Global distribution and environmental suitability for chikungunya virus, 1952 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 20, p. 30234, maio 2016.
- NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.
- OO, A. et al. Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. **Antiviral Research**, v. 150, n. November 2017, p. 101–111, 2018.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502–6, abr. 2002.
- PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian Red Propolis: Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–Photodiode Array Detection/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6484–6491, jun. 2011.
- PORTO, I. C. C. DE M. et al. Mechanical and aesthetics compatibility of Brazilian red propolis micellar nanocomposite as a cavity cleaning agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 219, dez. 2018.
- POWERS, A. M. et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.
- RICE, W. G.; BADER, J. P. Discovery and in Vitro Development of AIDS Antiviral Drugs as Biopharmaceuticals. **Advances in Pharmacology**, v. 33, n. C, p. 389–438, jan. 1995.
- RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, out. 2011.
- ROMERO, M. R. et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an “in vitro” replicative system. **Antiviral Research**, v. 68, n. 2, p. 75–83, 2005.
- ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 02, p. 177–191, jun. 1956.
- RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, n. February, p. 74–82, 2018.
- SANTIAGO, K. B. et al. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of a propolis-containing mouthwash on human monocytes. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 8, p. 1–8, 2016.
- SANTOS, N. S. DE O. **Virologia Humana 3° Edição**. 3° ed. [s.l: s.n.].
- SCHNITZLER, P. et al. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. S1, p. S20–S28, jan. 2010.

- SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.
- SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 1, p. 139–144, 2001.
- SHAH, S. T. et al. Magnetically directed antioxidant and antimicrobial agent: synthesis and surface functionalization of magnetite with quercetin. **PeerJ**, v. 7, p. e7651, nov. 2019.
- SILVA-JUNIOR, E. F. et al. Dynamic Simulation, Docking and DFT Studies Applied to a Set of Anti-Acetylcholinesterase Inhibitors in the enzyme  $\beta$ -Secretase (BACE-1): An Important Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 13, n. 4, nov. 2017.
- SILVA, B. B. “ Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica ”. 2008.
- SIMONI, I. C. et al. In vitro antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpesviruses. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, n. 0, ago. 2018.
- SITHISARN, P. et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Research**, v. 97, n. 1, p. 41–48, 2013.
- SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 33, n. 11, 1995.
- TANABE, E. L. DE L. et al. Report of East-Central South African Chikungunya virus genotype during the 2016 outbreak in the Alagoas State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2018a.
- TANABE, I. S. B. et al. **Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection** *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2018b.
- TAUBITZ, W. et al. Chikungunya Fever in Travelers: Clinical Presentation and Course. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. e1–e4, 2007.
- THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.
- TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249–254, jun. 2006.
- TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.
- VAN AALST, M. et al. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 8–22, 2017.
- VELOZ, J. J.; ALVEAR, M.; SALAZAR, L. A. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed

by X-ray crystallography. **Nature**, 2010.

**WAHID, B. et al.** Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, **2017**.

YAO, J. N. et al. Discovery and anticancer evaluation of a formononetin derivative against gastric cancer SGC7901 cells. **Investigational New Drugs**, p. 1300–1308, 2019.

YILDIRIM, A. et al. Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 422–430, 2016.

YU, Y. et al. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, n. 235, p. 91–101, 2018.

ZANDI, K. et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal**, v. 8, p. 1–11, 2011.

ZHU, L. et al. Licorice isoliquiritigenin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro and prevents inflammatory bone loss in vivo. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 7, p. 1139–1152, 2012.

## APÊNDICE

Artigos publicados:

1. PASSOS, Gabriel Felipe Silva et al. Computer-Aided Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of Novel Acrylamides as Potential Inhibitors of E3-E2-E1 Glycoproteins Complex from Chikungunya Virus. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 7, p. 141, 2020.



pharmaceuticals



Article

### Computer-Aided Design, Synthesis, and Antiviral Evaluation of Novel Acrylamides as Potential Inhibitors of E3-E2-E1 Glycoproteins Complex from Chikungunya Virus

Gabriel Felipe Silva Passos<sup>1</sup>, Matheus Gabriel Moura Gomes<sup>1</sup>, Thiago Mendonça de Aquino<sup>2</sup>, João Xavier de Araújo-Júnior<sup>1</sup>, Stephannie Janaina Maia de Souza<sup>3</sup>, João Pedro Monteiro Cavalcante<sup>3</sup>, Elane Conceição dos Santos<sup>3</sup>, Ênio José Bassi<sup>3</sup> and Edeildo Ferreira da Silva-Júnior<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Institute, Federal University of Alagoas, Maceió 57072-970, Brazil; gabrielfelipepassos@gmail.com (G.F.S.P.); matheus\_gabriel199@hotmail.com (M.G.M.G.); jotaaraujo2004@gmail.com (J.X.d.A.-J.)

<sup>2</sup> Center of Analysis and Research in Nuclear Magnetic Resonance, Chemistry and Biotechnology Institute, Federal University of Alagoas, Maceió 57072-970, Brazil; thiago.aquino@iqb.ufal.br

<sup>3</sup> Immunoregulation Research Group, Laboratory of Research in Virology and Immunology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Maceió 57072-970, Brazil; stephanniemai92@gmail.com (S.J.M.d.S.); j.p.monteirocavalcante@gmail.com (J.P.M.C.); elane.santos@icbs.ufal.br (E.C.d.S.); enio.bassi@icbs.ufal.br (Ê.J.B.)

\* Correspondence: edeildo.junior@iqb.ufal.br; Tel.: +55-87-9-9610-8311

Received: 31 May 2020; Accepted: 25 June 2020; Published: 30 June 2020



**Abstract:** Chikungunya virus (CHIKV) causes an infectious disease characterized by inflammation and pain of the musculoskeletal tissues accompanied by swelling in the joints and cartilage damage. Currently, there are no licensed vaccines or chemotherapeutic agents to prevent or treat CHIKV infections. In this context, our research aimed to explore the potential *in vitro* anti-CHIKV activity of acrylamide derivatives. *In silico* methods were applied to 132 Michael's acceptors toward the six most important biological targets from CHIKV. Subsequently, the ten most promising acrylamides were selected and synthesized. From the cytotoxicity MTT assay, we verified that LQM330, 334, and 336 demonstrate high cell viability at 40  $\mu$ M. Moreover, these derivatives exhibited anti-CHIKV activities, highlighting the compound LQM334 which exhibited an inhibition value of 81%. Thus, docking simulations were performed to suggest a potential CHIKV-target for LQM334. It was observed that the LQM334 has a high affinity towards the E3-E2-E1 glycoproteins complex. Moreover, LQM334 reduced the percentage of CHIKV-positive cells from 74.07 to 0.88%, 48h post-treatment on intracellular flow cytometry staining. In conclusion, all virtual simulations corroborated with experimental results, and LQM334 could be used as a promising anti-CHIKV scaffold for designing new drugs in the future.

**Keywords:** virtual screening; acrylamides; chikungunya virus; antiviral; molecular docking; E3-E2-E1 glycoproteins complex

2. TANABE, Ithallo SB et al. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 113, n. 11, p. 730-733, 2019.

*Trans R Soc Trop Med Hyg* 2019; **00**: 1–4  
doi:10.1093/trstmh/trz065



## Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase

Ithallo S. B. Tanabe<sup>a</sup>, Elaine C. Santos<sup>a</sup>, Eloiza L. L. Tanabe<sup>a</sup>, Stephannie J. M. Souza<sup>a</sup>, Fabio E. F. Santos<sup>a</sup>, Jamile Taniele-Silva<sup>a</sup>, Jean F. G. Ferro<sup>b</sup>, Magliones C. Lima<sup>b</sup>, Adriana A. Moura<sup>c</sup>, Leticia Anderson<sup>a,d</sup> and Énio J. Bossi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>IMUNOREG – Grupo de Pesquisa em Regulação da Resposta Imune, Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>b</sup>Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas, 57036-850, Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>c</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brazil; <sup>d</sup>Centro Universitário CESMAC, 57081-350, Maceió, Alagoas, Brazil

\*Corresponding author: Tel: +55-82-3216-1536; E-mail: enio.bossi@fcb.ufal.br

Received 18 March 2019; revised 8 June 2019; editorial decision 24 June 2019; accepted 25 June 2019

**Background:** The immune response against the Chikungunya virus (CHIKV) during the very early acute phase is not fully elucidated. Therefore we explored the cytokine and chemokine profile triggered by CHIKV in infected patients.

**Methods:** Cytokines, chemokines and C5a anaphylatoxin were analysed in serum from CHIKV-infected patients during the viraemic phase (mean 2.97±1.27 d after illness onset) compared with a healthy group.

**Results:** CHIKV-infected patients had a significant increase of interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (CXCL8/IL-8), interleukin-10 (IL-10), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), monokine induced by interferon- $\gamma$  (CXCL5/MIG), monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2/MCP-1), interferon- $\gamma$ -induced protein 10 (CXCL10/IP-10) and complement C5a anaphylatoxin.

**Conclusions:** The very early acute immune response triggered against CHIKV leads to an increase in pro-inflammatory immune mediators such as IFN- $\gamma$  and its induced chemokines, and a high level of C5a anaphylatoxin as a result of complement activation.

**Keywords:** acute immune response, arboviruses, chemokines, chikungunya virus, complement system, cytokines