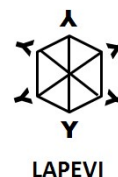




UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS



FABIO EMANUEL FRANÇA DOS SANTOS

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

Maceió

2020

FABIO EMANUEL FRANÇA DOS SANTOS

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

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Bacharelado, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

Maceió

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade – CRB-4 - 1251

S237a Santos, Fabio Emanuel Franca dos.

Avaliação da atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas contra o vírus zika in vitro / Fabio Emanuel Franca dos Santos. – 2020.
50 f.

Orientador: Enio Jose Bassi

Monografia (Trabalho de conclusão de curso em bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 45-50.

1. Zika virus. 2. Agentes antivirais. 3. Própolis vermelha. 4. Própolis vermelha de Alagoas. II. Título.

CDU: 578.74

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabio Emanuel França dos Santos

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

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, bacharelado, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas

Aprovado em ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

Banca Examinadora:

Dr. Edeildo Ferreira da Silva Júnior

Dr. Lucas Anhezini de Araújo

DEDICATÓRIA

Dedico à Deus,
à minha mãe Josenice França,
à minha esposa Beatriz Liane,
Aos meus amigos da vida, graduação e do laboratório.
Vocês foram a ponte que possibilitou a minha chegada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus por sempre me guardar e abençoar, mostrando sempre o melhor caminho a seguir. A Ele toda honra e toda a glória.

À minha amada mãe, Josenice França, por todo amor, esforço e dedicação a mim. Sem ela eu não teria chegado até aqui.

À Universidade Federal de Alagoas e ao Laboratório de Pesquisas em Virologia e Imunologia (LAPEVI) por todo o conhecimento oferecido e por possibilitar a realização do meu projeto de pesquisa.

À minha amada esposa, Beatriz Liane, por me acompanhar durante toda esta caminhada, sempre me suportando e me dando forças pra lutar até o fim.

Ao meu orientador Dr. Ênio José Bassi, uma das pessoas mais incríveis que já tive oportunidade de conhecer. Amigo, professor e excelente pesquisador. Agradeço pela oportunidade de fazer parte do laboratório, por toda a paciência, generosidade e atenção, sempre acreditando no meu potencial e me estimulando a querer aprender cada vez mais.

À professora Dr^a Leticia Anderson por todo suporte e disposição a ajudar sempre que necessário e por todo conhecimento compartilhado.

Às professoras Dr^a Silvana Ayres, Dr^a Alessandra Abel Borges e à técnica Ana Raquel por todo o suporte científico oferecido durante todo o meu trajeto no LAPEVI.

Aos professores Dr. Jean P. S. Peron e Edson L. Durigon da Universidade de São Paulo por gentilmente cederem o vírus Zika ao laboratório.

Aos meus amigos do LAPEVI, Ithalo, Eloiza, Elane, Thiago, João Pedro, Grazy, Maria Julia, Julia Brandão, Thayná, Ana Carla, Maria Luiza, Gabriel, Yses e Jamile por todo companheirismo e experiências compartilhadas. Em especial gostaria de agradecer à minha parceira de experimentos Stephannie Maia por estar sempre disposta a me ajudar e por sua amizade em todos momentos.

Aos meus colegas de graduação que de alguma forma contribuíram para a minha formação, em especial ao meu parceiro Julianderson por sempre me fazer acreditar que sou capaz, à minha amiga Alana Letícia por todo carinho e broncas nas horas necessárias e às minhas irmãs que a UFAL me deu, Morgana Melo e Larissa Santos por todas as experiências vivenciadas e por sempre me ajudarem a estudar.

Ao professor Dr. Ticiano Gomes Nascimento por gentilmente fornecer as amostras de própolis vermelha utilizadas neste projeto.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos e familiares por todo suporte emocional nos momentos difíceis e também por todas as alegrias proporcionadas. Muito obrigado a todos.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus causador de uma doença febril de caráter agudo que tem sido associada a microcefalia e à síndrome de Guillain-Barré, sendo assim um grave problema de saúde pública. Atualmente ainda não existem medicamentos específicos para o tratamento desta infecção, assim, torna-se de extrema importância a descoberta de novos compostos que possam apresentar atividade antiviral contra esse vírus. Neste cenário, a própolis vermelha é um composto natural caracterizado por possuir diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividades antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral. No entanto, a atividade antiviral deste composto contra o ZIKV ainda não foi estudada. Assim, o objetivo do presente trabalho consistiu em avaliar a ação antiviral do extrato bruto (EB), das frações hexânica (FH) e da fração acetato de etila (FAE) da própolis vermelha de Alagoas contra o ZIKV *in vitro*. Inicialmente, a citotoxicidade de diferentes concentrações dos compostos sobre monocamadas de células Vero E6 e A549 foi avaliada por meio do ensaio de MTT para determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) para estas células. A atividade antiviral foi avaliada mediante os ensaios de pré e pós-tratamento com os compostos, sendo realizado o ensaio colorimétrico de MTT para determinação da porcentagem de inibição viral. Além disso, para confirmar a ação antiviral dos compostos, análises por citometria de fluxo foram realizadas mediante a marcação intracelular do ZIKV em células Vero E6. Como resultado, foi observado que a CMNT obtida foi de 100 µg/mL em células VERO e 50 µg/mL em células humanas A549 para o EB e 10 µg/mL para ambas as frações FH e FAE nestas células. No ensaio de pré-tratamento, os compostos testados não demonstraram atividade antiviral relevante, no entanto, no pós-tratamento, todos os compostos testados apresentaram altos percentuais de inibição contra o vírus nas maiores concentrações testadas, posteriormente sendo confirmadas por citometria de fluxo. Em conclusão, este estudo mostrou que a própolis vermelha de Alagoas possui uma promissora atividade antiviral contra o ZIKV *in vitro*. Assim, estudos futuros para elucidação do mecanismo de ação e detecção e isolamento de moléculas biologicamente ativas presentes deverão ser realizados, contribuindo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento desta arbovirose.

Palavras-chave: Vírus Zika, própolis vermelha brasileira, atividade antiviral.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that causes an acute febrile illness that has been associated with microcephaly and Guillain-Barré syndrome, thus being a serious public health problem worldwide. Currently, there are no specific drugs for the treatment of this infection, so it is extremely important to discover new compounds that may have biological activity against this virus. In this scenario, red propolis is a natural compound characterized by having several pharmacological properties, including antibacterial, anti-inflammatory and antiviral activities. However, the antiviral activity of this compound against ZIKV has not yet been elucidated. Thus, the aim of this study was to evaluate the antiviral activity of crude extract (CE), hexane (HF) and the ethyl acetate fractions (EAF) of Alagoas red propolis against ZIKV *in vitro*. Firstly, the cytotoxicity of different concentrations of compounds was evaluated on Vero E6 and A549 cell monolayers by MTT cell viability assay to determine the maximum non-toxic concentration (MNTC) for these cells. The antiviral activity was evaluated by pre- and post-treatment tests with the compounds, and the MTT colorimetric test was performed to determine the percentage of virus inhibition. In addition, to confirm the antiviral activity of the compounds, the intracellular labeling of ZIKV was performed in Vero E6 cell followed by flow cytometry analysis. As result, it was observed that the maximum nontoxic concentration (MNTC) was 100 µg/mL in Vero E6 cells and 50 µg/mL in human A549 cells for CE and 10 µg/mL for both HF and EAF fractions in both these cells. In the pre-treatment test, no significant antiviral activity was observed for the compounds, however, in the post-treatment assay all compounds showed high virus inhibition against the ZIKV in the highest tested concentrations, and this result was later confirmed by intracellular flow cytometry. In conclusion, this study demonstrated that Alagoas red propolis has a promising antiviral activity against ZIKV *in vitro*. Thus, future studies to elucidate the mechanism of action and both detection and isolation of biologically active molecules present should be carried out, contributing to the development of new drugs for the treatment of this arbovirus disease.

Keywords: Zika virus, Brazilian red propolis, antiviral activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dispersão temporal do ZIKV pelo mundo.....	16
Figura 2: Partícula viral e estrutura genômica do vírus Zika.....	17
Figura 3: Ciclo de replicação dos flavivírus.....	18
Figura 4: Formas de transmissão do vírus Zika.....	20
Figura 5: Própolis vermelha e sua origem botânica.....	23
Figura 6: Infecção de células C6/36 pelo ZIKV.....	31
Figura 7: Infecção de células Vero E6 pelo ZIKV <i>in vitro</i>	32
Figura 8: Viabilidade celular (%) das monocamadas celulares tratadas com diferentes diluições do ZIKV.....	32
Figura 9: Determinação da citotoxicidade do EB, FH e FAE da própolis vermelha de Alagoas em células Vero E6.....	33
Figura 10: Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pré-tratamento em células Vero E6.....	34
Figura 11: Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pós-tratamento em células Vero E6.....	35
Figura 12: Detecção da porcentagem de células positivas infectadas pelo ZIKV por citometria de fluxo intracelular.....	36
Figura 13: Gráfico exibindo a média \pm erro padrão (SEM) da porcentagem de células positivas para infecção viral avaliada por marcação intracelular do ZIKV e análise por citometria de fluxo.....	37
Figura 14: Determinação da citotoxicidade do EB, FH e FAE da própolis vermelha de Alagoas em células A549.....	38
Figura 15: Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pré-tratamento em células A549.....	38
Figura 16: Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pós-tratamento em células A549.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração das soluções iniciais e das concentrações iniciais testadas nos ensaios.....27

Tabela 2: Concentrações máximas não-tóxicas (CMNT) e concentrações tóxicas a 50% das células (CC_{50}) do EB, FH e FAE em células Vero E6 *in vitro*.....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRP: do inglês “Brazilian red propolis”

C: Proteína do capsídeo

CC: Controle celular

CC₅₀: Concentração citotóxica a 50% da monocamada celular

CE₅₀: Concentração efetiva que protege 50% da monocamada celular

CMNT: Concentração máxima não tóxica

CN: Controle negativo

CV: controle viral

DENV: Vírus dengue

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: do inglês “Dulbecco’s modified eagle medium”

E: Proteína do envelope

EB: Extrato bruto

FAE: Fração acetato de etila

FH: Fração hexânica

IS: Índice de seletividade

L-15: meio de cultura Leibovitz

M: Proteína da membrana

MTT: Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2yL)-2,5-difenil tetrazólio

Nm: Nanômetro

NS: Proteínas não estruturais

PBS: Tampão salina fosfato

prém: Proteína precursora da membrana

PSA: Antibiótico contendo penicilina, estreptomina e anfotericina

PVA: Própolis vermelha de Alagoas

SBF: Soro fetal bovino

YFV: Vírus da febre amarela

ZIKV: Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Histórico e epidemiologia viral.....	15
2.2 Vírus Zika: classificação, características estruturais e replicação	16
2.3 Formas de transmissão	19
2.4 Sintomas e complicações.....	20
2.4 Própolis	21
2.5 Própolis vermelha brasileira	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Cultivo celular e linhagens celulares.....	26
4.2 Obtenção do estoque do ZIKV	26
4.3 Extrato bruto (EB) e frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE) da própolis vermelha.....	27
4.4 Ensaio de citotoxicidade.....	28
4.5 Infecção de células Vero E6 com ZIKV para determinação da viabilidade celular	29
4.6 Ensaio de avaliação da atividade antiviral.....	29
4.6.1 Ensaio de Pré-Tratamento	29
4.6.2. Ensaio de Pós-Tratamento.....	30
4.7 Detecção da infecção celular por citometria de fluxo intracelular	30
4.8 Análise estatística	31
5. RESULTADOS	32
5.1- Obtenção do estoque de ZIKV em células C6/36 de <i>Aedes albopictus</i>	32
5.2 Infecção de células Vero E6 com o ZIKV.....	32
5.3 Determinação da citotoxicidade da PVA e suas frações em células Vero E6 .	33
5.4 Avaliação da atividade antiviral no ensaio de pré-tratamento.....	35
5.5 Avaliação da atividade antiviral no ensaio de pós-tratamento	35
5.6 Determinação da percentagem de células infectadas pelo ZIKV por citometria de fluxo intracelular	36
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus (do inglês, “*arthropod-borne virus*”) que pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, o qual apresenta um genoma de RNA de fita simples e polaridade positiva (KUNO et al., 1998). Este vírus possui atualmente, duas linhagens conhecidas: uma africana, que subdivide-se em linhagem do leste e linhagem do oeste, e uma asiática (FAYE et al., 2014).

Após o seu primeiro isolamento em 1947 na floresta Zika, Uganda, apenas alguns casos esporádicos de infecção em humanos pelo ZIKV foram registrados, sendo estes restritos aos continentes africano e asiático (HAYES, 2009). No entanto, nos últimos anos o vírus se dispersou pelo mundo e foi responsável por grandes surtos de infecção na ilha de Yap na Micronésia (2007), na Polinésia Francesa (2013) e no Brasil (2015), de onde disseminou-se para as Américas (BROGUEIRA; MIRANDA, 2015).

A principal forma de transmissão desta arbovirose ocorre durante a hematofagia de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* infectadas (CUETO et al., 2011). No entanto, além da transmissão vetorial, outras formas de infecção têm sido relatadas, tais como a sexual, transfusional e vertical.

A infecção em humanos geralmente não apresenta manifestações clínicas, sendo os casos sintomáticos de natureza autolimitada, caracterizados por febre baixa, *rash* cutâneo, hiperemia conjuntival e mialgia. Entretanto, a infecção pelo ZIKV tem sido associada a graves complicações neurológicas, incluindo a síndrome de Guillain-Barré e à anomalias congênitas como a microcefalia, fato este que levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar estado de emergência de saúde pública de interesse internacional em fevereiro de 2016 (BMJ, 2016).

Apesar dos graves problemas clínicos provocados pelo ZIKV, atualmente ainda não existem vacinas ou fármacos licenciados para o tratamento específico desta arbovirose, apenas medidas paliativas direcionadas ao alívio dos sintomas (SAIZ; MARTÍN-ACEBES, 2017). Deste modo, torna-se necessária a realização de estudos para a identificação de novos fármacos que apresentem atividade contra este vírus.

Neste contexto, os compostos de origem natural têm sido alvo de diversos estudos farmacológicos para descoberta de novos agentes terapêuticos, devido à

grande diversidade de moléculas biologicamente ativas presentes em suas composições (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006). Dentre os compostos naturais, a própolis vermelha tem se destacado por sua complexa composição química e inúmeras atividades farmacológicas apresentadas, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antiviral, dentre outras (ALENCAR et al., 2007). No entanto, não há até o presente momento estudos que tenham avaliado a atividade antiviral da mesma contra o ZIKV. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a hipótese de que a própolis vermelha tenha ação antiviral contra o ZIKV *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico e epidemiologia viral

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez em 1947, a partir de macacos *Rhesus* (*Macaca mulata*) durante um trabalho de pesquisa do vírus da febre amarela, realizado na floresta Zika localizada em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Posteriormente, em 1952, na Nigéria ocorreram os primeiros casos de infecção humana, no entanto, o ZIKV foi negligenciado por apresentar uma infecção benigna e autolimitada, sendo responsável por apenas casos esporádicos de infecções que ficaram restritas aos continentes africano e asiático (MACNAMARA, 1954).

No ano de 2007, um surto provocado pelo ZIKV na ilha de Yap na Micronésia ganhou destaque por ter ocorrido numa região isolada do pacífico, sendo que aproximadamente 75% da população local foi infectada (DUFFY et al., 2009). Até então, apenas 14 casos de infecções humanas haviam sido relatadas (FAYE et al., 2014).

Anos depois, um segundo grande surto de infecção pelo ZIKV foi registrado na Polinésia Francesa, entre os anos de 2013 e 2014, numa escala sem precedentes, sendo estimado mais de 28.000 casos correspondendo a aproximadamente 11% da população local (MUSSO, D; NILLES, 2014). Naquele período, o ZIKV foi associado à síndrome de Guillain-Barré (SGB), tendo em vista o aumento do número de casos desta patologia reportados durante o surto.

Logo após o ocorrido na Polinésia Francesa, o vírus disseminou-se por outras ilhas do Pacífico (Ilha de Páscoa, Nova Caledônia, Ilhas Cook, Ilhas Salomão, Vanuatu, Samoa e Fiji), sendo responsável por surtos nestes locais (MUSSO, DIDIER; GUBLER, 2016).

No Brasil, os primeiros casos de transmissão autóctone do ZIKV foram registrados em março de 2015, no Rio Grande do Norte (ZANLUCA et al., 2015), sendo estimado que até dezembro daquele mesmo ano tenham ocorrido de 440.000 a 1.300.000 casos prováveis de infecção por este vírus (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016).

A análise filogenética do vírus circulante no Brasil revelou uma homologia genética de 99% com a cepa isolada da Polinésia Francesa, sendo vírus pertencente a linhagem asiática (ZANLUCA et al., 2015). Deste modo, é provável que o vírus tenha

sido introduzido no Brasil durante o campeonato mundial de canoagem, ocorrido em 2014 no Rio de Janeiro no qual participaram seleções de diversas ilhas do Pacífico, afetadas naquela época por surtos de ZIKV (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha da Páscoa) (MUSSO, DIDIER; BELTRAME; ZAMMARCHI, 2016).

A ampla distribuição de mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti* e *A. albopictus*), principais vetores de transmissão desta arbovirose favoreceu a emergência do ZIKV no Brasil e a sua rápida dispersão para as américas.

Em resumo, o histórico temporal da dispersão do ZIKV pelo mundo é mostrado na Figura 1.

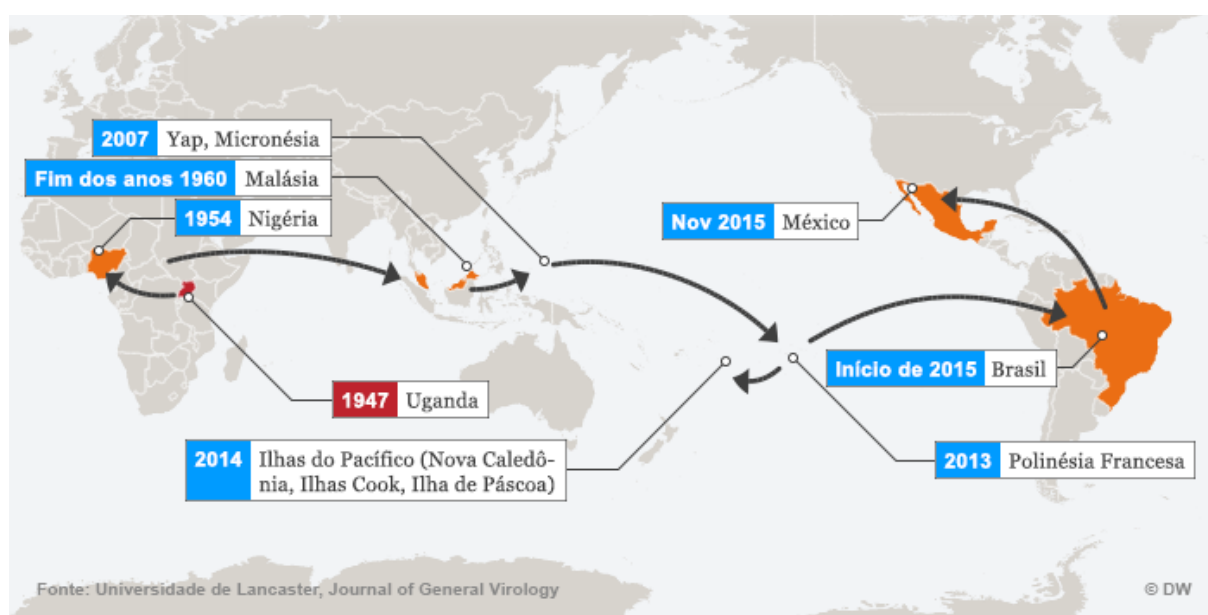


Figura 1. Dispersão temporal do ZIKV pelo mundo. Disponível em: <https://www.dw.com/pt-br/europa-pode-ter-surto-de-zika-nos-pr%C3%B3ximos-meses-alerta-oms/a-19266782>. Acesso em 03/03/2020.

2.2 Vírus Zika: classificação, características estruturais e replicação

O ZIKV é pertencente à família *Flaviviridae*, na qual estão inclusos alguns vírus bastante conhecidos por serem causadores de doenças em humanos, tais como, o vírus da dengue (DENV) e o vírus da febre amarela (YFV).

De forma semelhante a outros flavivírus, o ZIKV possui partícula viral envelopada e esférica de aproximadamente 50 nm de diâmetro. O genoma deste vírus é constituído de RNA de fita simples e polaridade positiva, ou seja, possui o mesmo

sentido que o RNA mensageiro, sendo desta forma traduzido imediatamente após a infecção da célula hospedeira. Este RNA codifica uma poliproteína que é processada em três proteínas estruturais que formam a partícula viral : o capsídeo (C), a precursora da membrana (prM) e a proteína do envelope (E), além de sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) que estão envolvidas na replicação do RNA gênomico viral (Figura 2) (GÖERTZ et al., 2018).

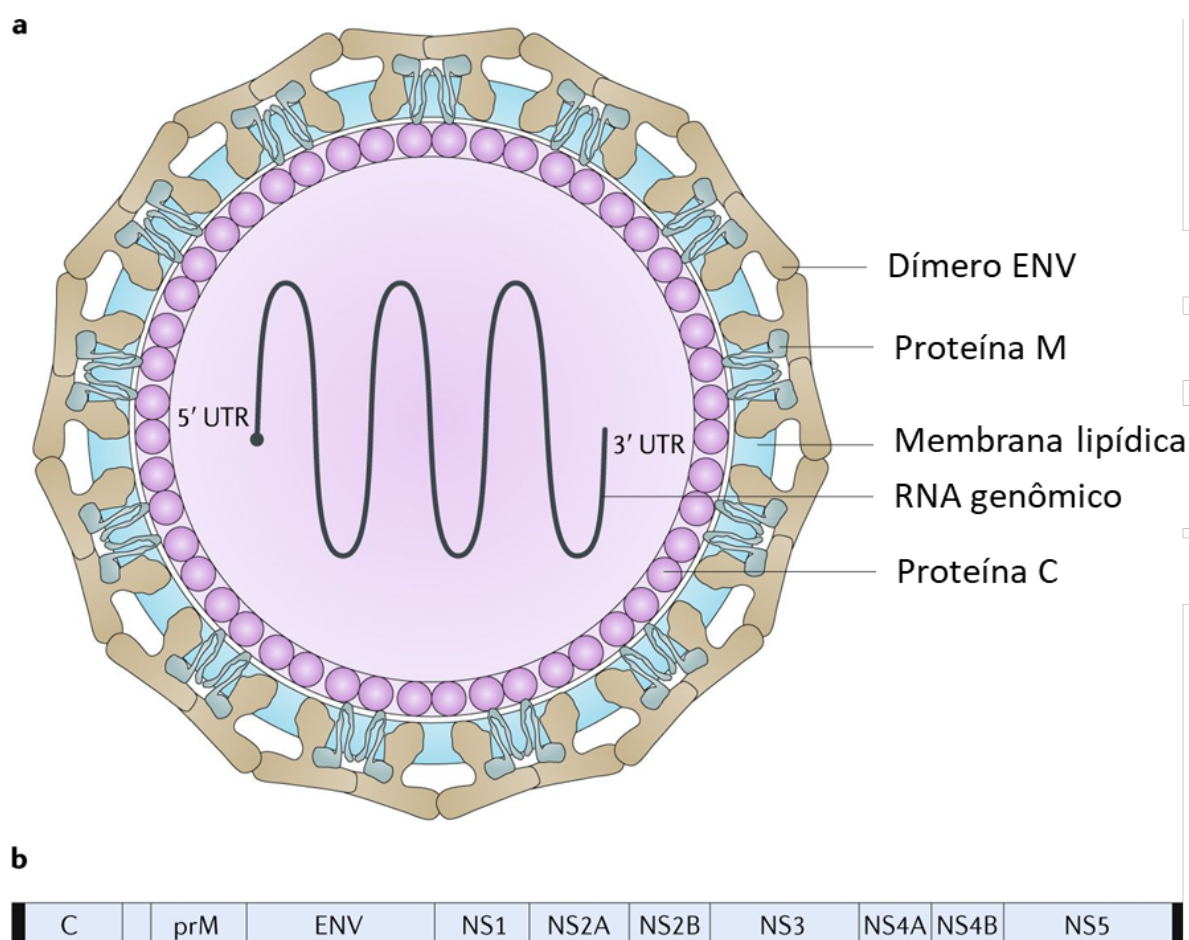


Figura 2. Partícula viral e estrutura genômica do vírus Zika. a) Esquema representativo da estrutura da partícula viral contendo o RNA fita simples de polaridade positiva, envelope viral e proteínas estruturais. b) Esquema representativo da organização do genoma viral. Fonte: adaptado de (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018).

O ciclo de replicação do ZIKV se inicia com a adsorção do vírus à membrana da célula hospedeira por meio da interação das glicoproteínas da superfície viral com os receptores celulares. A partícula viral é então internalizada por meio de vesículas endocíticas formadas por proteínas do tipo clatrina e transportada aos endossomos onde o baixo pH causa alterações conformacionais na glicoproteína E do envelope

viral e promove a fusão entre o envelope e o endossomo, liberando o RNA viral no citoplasma da célula para a tradução (KUIVANEN et al., 2017). O RNA é traduzido como uma poliproteína que posteriormente é clivada por proteases virais e celulares, formando as proteínas estruturais e não estruturais (ZHANG RONG, 2017). Após a síntese destas proteínas, novas partículas virais imaturas são montadas no retículo endoplasmático e tornam-se envelopadas por aquisição de uma bicamada lipídica proveniente desta organela, porém ainda não possuem capacidade de infectar células. Posteriormente, as partículas imaturas são transportadas ao complexo de Golgi e passam por um processo de maturação por meio da clivagem do precursor prM em proteína M e peptídeo *pr* pelas proteases furinas dando origem à partículas virais maduras, as quais serão liberadas por exocitose, conforme mostrado na figura 3 (ATIF et al., 2016).

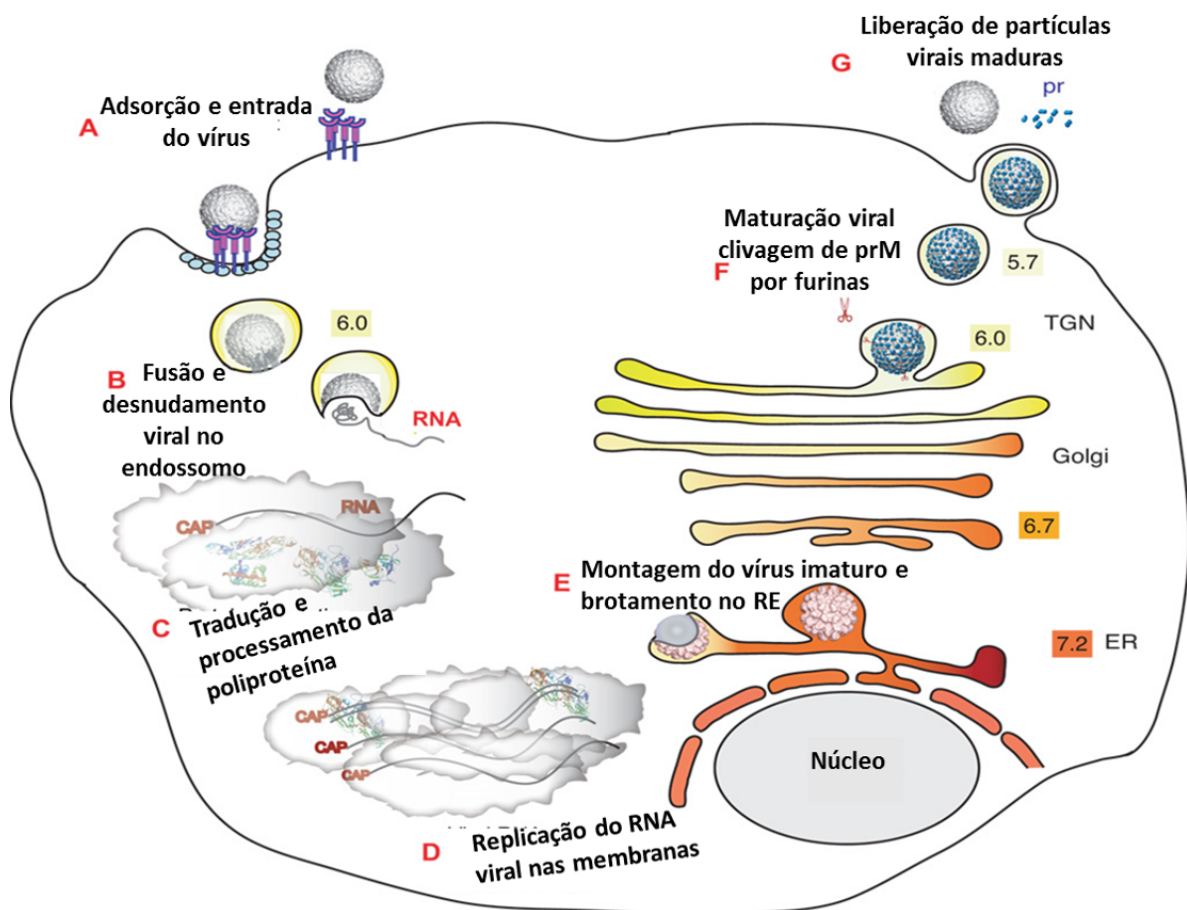


Figura 3. Ciclo de replicação dos flavivírus. A) Os virions se ligam aos receptores celulares e são internalizados por endocitose. B) O baixo pH do endossomo promove a fusão das membranas virais e celulares, desmontagem da partícula viral e a liberação de RNA no citoplasma. C) O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. D) Proteínas virais não estruturais replicam o RNA do genoma. E) A montagem de partículas virais imaturas ocorre na membrana do retículo endoplasmático. F) Partículas de vírus imaturas são transportadas pela via

secretora. No baixo pH do trans-Golgi, a clivagem de prM mediada por furina leva à maturação do vírus. G) O vírus maduro é liberado para o meio extracelular. Os números mostrados nas caixas coloridas referem-se ao pH dos respectivos compartimentos. Fonte: Adaptado de (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

2.3 Formas de transmissão

A principal forma de infecção humana com o ZIKV é a vetorial e esta ocorre durante a hematofagia de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* infectados com o vírus, principalmente as espécies *A. aegypt* e *A. albopictus* (BOYER et al., 2018). O vetor é infectado após a ingestão de partículas virais presentes no sangue de macacos ou humanos infectados e, após um período de incubação de até 12 dias no estômago do mosquito, o vírus chega às glândulas salivares, sendo transmitido para outros hospedeiros durante um novo repasto sanguíneo (GUERBOIS et al., 2016).

Paralelamente, a transmissão desta arbovirose também pode ocorrer na ausência do mosquito vetor por via vertical, da mãe para o feto, sexual e por meio de transfusões sanguíneas (Figura 4) (BESNARD et al., 2014). O ZIKV já foi detectado em fluidos biológicos humanos, como na urina e na saliva (MUSSO DIDIER, ROCHE CLAUDINE, ROBIN EMILIE, NHAN TUXUAN, TESSIER ANITA, 2015; MUSSO, DIDIER et al., 2015). Sendo assim, os resultados de Musso e colaboradores (2015) revelaram que a urina, o sêmen e a saliva foram os fluídos que apresentaram reação positiva para RNA do ZIKV em pacientes infectados por duas ou mais semanas e, assim, úteis como material para diagnóstico e estudos clínicos não invasivos, levantando fortes indícios de transmissão por fluidos biológicos (MUSSO DIDIER, ROCHE CLAUDINE, ROBIN EMILIE, NHAN TUXUAN, TESSIER ANITA, 2015; MUSSO, DIDIER et al., 2015).

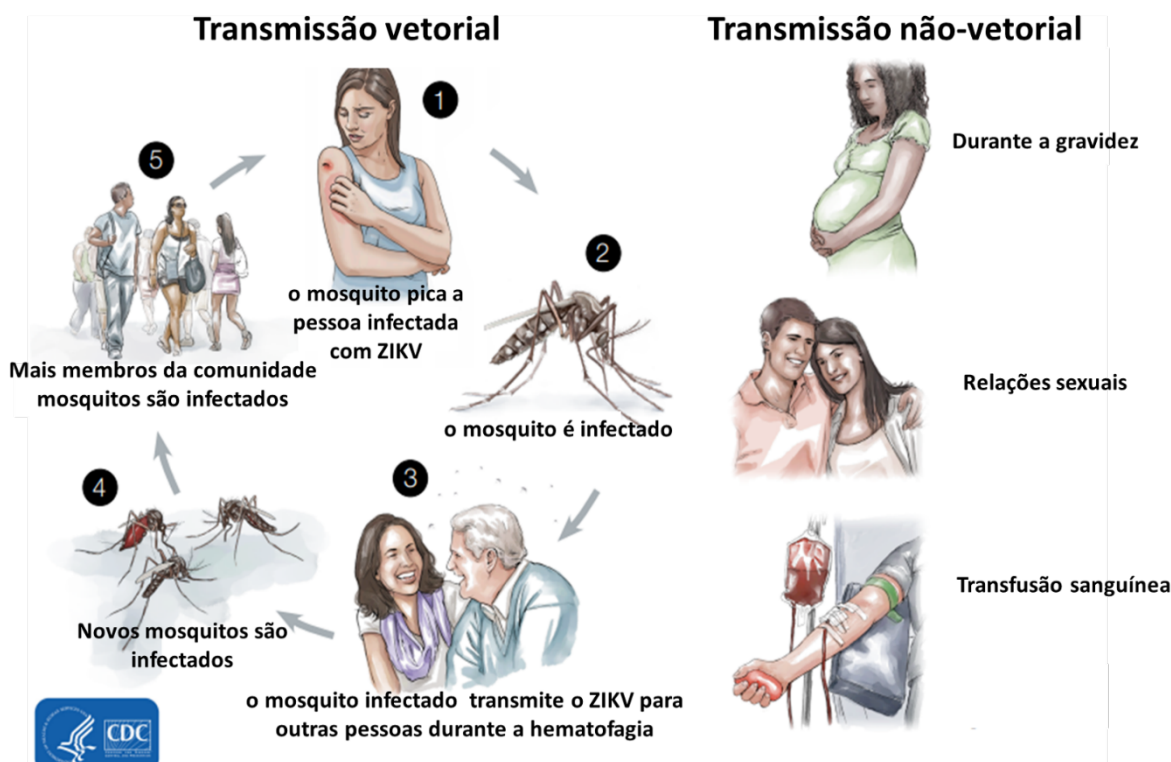


Figura 4. Formas de transmissão do vírus Zika. Transmissão vetorial e não vetorial. Fonte: Adaptado de CDC. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/zika-transmission-infographic.pdf>. Acesso em 23/03/2020.

2.4 Sintomas e complicações

A maioria das infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas (em aproximadamente 80% dos casos) contribuindo assim para uma subnotificação do número de casos (KOOL et al., 2009). Por outro lado, nos casos sintomáticos as manifestações mais comuns são exantema, febre baixa, artralgia nas pequenas articulações das mãos e pés, fadiga, conjuntivite não purulenta, dor de cabeça, edema, vômito e outros sintomas semelhantes aos causados pelo DENV, podendo perdurar por aproximadamente uma semana (ZANLUCA et al., 2015).

Apesar de as infecções causadas pelo ZIKV serem geralmente consideradas de caráter benigno e autolimitado, nos últimos anos, este vírus tem sido associado a complicações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré e a malformações congênitas, como a microcefalia (CAO-LORMEAU; 2; et al., 2016; DE ARAÚJO et al., 2016).

A síndrome de Guillain-Barré é uma doença neurológica e autoimune que afeta o sistema nervoso, provocando fraqueza e paralisia muscular. Durante o surto de ZIKV

na Polinésia Francesa, entre os anos de 2013 e 2014, foi observado um aumento considerável no número de casos desta síndrome, em relação aos anos anteriores, em pacientes previamente infectados com este vírus (CAO-LORMEAU; BLAKE; et al., 2016).

Outra grave complicação associada à infecção pelo ZIKV é a microcefalia, condição na qual o bebê nasce com o perímetro cefálico reduzido como consequência da baixa produção de células neurais, provocadas pela morte de células progenitoras (NUNES et al., 2016).

Durante o surto de ZIKV no Brasil, observou-se um aumento em cerca de 20 vezes do número de casos de microcefalia em relação à média dos quatro anos anteriores, sugerindo a sua possível associação com esta arbovirose (VARGAS et al., 2016). Além da microcefalia, a infecção pelo ZIKV durante a gestação foi associada a diversas alterações cerebrais em recém nascidos, tais como, deficiência intelectual, paralisia cerebral, epilepsia, distúrbios visuais, auditivos e comportamentais, sendo descrita como a síndrome congênita do Zika (ASHWAL, 2009).

Apesar das consequências clinicamente relevantes causadas à saúde humana por esta arbovirose, atualmente não existem vacinas ou fármacos antivirais licenciados para impedir a sua transmissão ou tratar de forma específica esta infecção, sendo adotadas apenas medidas paliativas para alívio dos sintomas. Deste modo, devido ao seu potencial no desenvolvimento de complicações neurológicas e interferências no desenvolvimento fetal, torna-se necessário a elaboração de um agente terapêutico eficaz contra este vírus. Dentre as possíveis alternativas destacam-se os compostos de origem natural que têm sido alvo de diversas pesquisas destinadas à descoberta de novos agentes terapêuticos, devido à grande diversidade de moléculas biologicamente ativas presentes em suas composições (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

2.4 Própolis

O desenvolvimento de fármacos antivirais tem sido um grande desafio ao longo dos anos, pois os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, dificultando a projeção de um tratamento antiviral que iniba a infecção viral sem prejudicar a célula hospedeira (PEREIRA, SOFIA, 2012). Nesse sentido, os produtos de origem natural têm demonstrado ser uma importante fonte para a descoberta de novos

medicamentos devido a diversidade de moléculas biologicamente ativas que são facilmente absorvidas e metabolizadas pelo organismo apresentando geralmente menos efeitos colaterais (KITASATO, 2007).

Dentre os produtos naturais, tem-se a própolis, que vem sendo amplamente utilizada na medicina popular por muitos anos, sendo constituída de um material resinoso e balsâmico coletado de exsudatos de diversas partes de plantas e adicionado de secreções e enzimas por abelhas (PEREIRA, SANTOS; SEIXAS; NETO, 2002). A sua composição química é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas e com a sazonalidade (BANKOVA, 2005). Além disso, o tipo de abelha produtora da própolis também interfere em sua composição (SILICI; KUTLUCA, 2005).

Atualmente, mais de 300 compostos já foram identificados nos diferentes tipos de própolis conhecidos (FROZZA, 2013). Dentre esses compostos estão os flavonóides, ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenóides, fenilpropanóides, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos graxos e outros compostos. Além de compostos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (LUTOSA, 2008).

Devido a sua alta diversidade em termos de composição química, inúmeras atividades biológicas da própolis tem sido descritas, como antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (ALMEIDA et al., 2016; VASCONCELOS et al., 2014). Além disso, foi mostrado que a própolis apresenta um potente efeito antiviral contra diversos tipos de vírus, como o vírus Herpes Simplex Tipo 1 e Tipo 2, calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina (CUETO et al., 2011; YILDIRIM et al., 2016).

É importante salientar que as propriedades farmacológicas da própolis estão intimamente ligadas à sua composição química, que é altamente complexa e varia de acordo com a região de coleta (YILDIRIM et al., 2016). Dependendo da cor, textura e composição química, a própolis pode ser classificada em 13 tipos diferentes (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Entre os diversos tipos de própolis, a própolis vermelha brasileira (BRP, do inglês, "*Brazilian Red Propolis*") tem sido amplamente estudada devido à presença de moléculas bioativas com potencial terapêutico em sua composição (ALMEIDA et al., 2016).

2.5 Própolis vermelha brasileira

Por meio de estudos que investigam as fontes vegetais da própolis vermelha foi possível identificar que a origem botânica deste composto é a *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como “Rabo-de-bugio”, sendo esta responsável pela coloração vermelha da própolis, devido a presença de isoflavonas em sua composição (Figura 5). De forma geral, este tipo de própolis é produzida após a coleta e processamento de exsudatos vermelhos presentes na superfície de *Dalbergia ecastophyllum*, por abelhas da espécie *Apis mellifera* (Figura 5) (BEZERRA GALINDO, 2007).

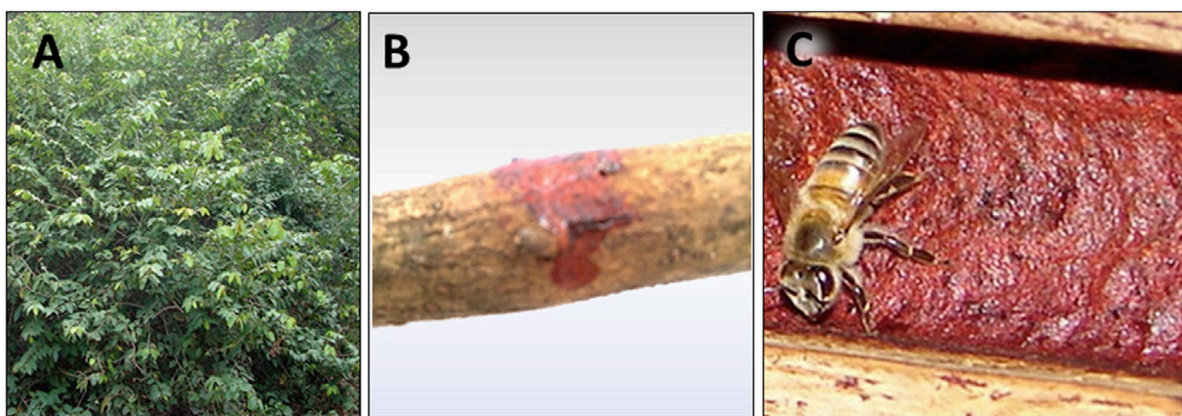


Figura 5. Própolis vermelha e sua origem botânica: (A *Dalbergia ecastophyllum*, origem botânica da Própolis vermelha brasileira. (B) exsudato vermelho típico de *Dalbergia ecastophyllum*, (C) As abelhas *Apis mellifera* coletam exsudato vermelho da superfície de *D. ecastophyllum* para fabricar a própolis. Fonte:(ALMEIDA et al., 2016)

Este tipo de própolis pode ser encontrado em colmeias localizadas em caules de manguezais e em regiões costeiras do nordeste, mais especificamente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Bahia e Sergipe (ALMEIDA et al., 2016).

A própolis vermelha é composta por uma série de moléculas distintas, incluindo substâncias das classes dos isoflavonóides, pterocarpanos, chalconas, flavonoides, benzofenonas preniladas, terpenos e taninos (ALENCAR et al., 2007; PICCINELLI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006).

Dentre estes grupos de moléculas, os principais marcadores químicos da BRP são os isoflavonoides, em especial a formononetina, biocanina A, pinocembrina e medicarpina, o que diferencia esta própolis das outras em relação a sua composição

química (ALMEIDA et al., 2016). Associada a esta complexa composição de moléculas, uma série de atividades biológicas foram descritas para a BRP, incluindo-se atividade antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (ALENCAR et al., 2007; BUENO-SILVA et al., 2013).

Apesar de apresentar uma diversidade de propriedades biológicas já conhecidas, o potencial antiviral da BRP ainda tem sido pouco explorado. No entanto recentemente, foi mostrada uma promissora atividade dos extratos deste tipo de própolis contra herpes vírus animais (SIMONI et al., 2018). Diante disto, apesar da ausência de relatos na literatura da atividade antiviral da BRP contra o ZIKV, este produto natural torna-se uma alternativa interessante para a avaliação de sua potencial atividade antiviral contra este vírus. Assim, a hipótese deste trabalho é que devido a sua composição química e às atividades biológicas já relatadas, a BRP possua atividade antiviral contra o ZIKV *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral do extrato bruto hidroalcoólico (EB) e frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE) da própolis vermelha de Alagoas (PVA) contra o ZIKV *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter estoques de ZIKV em células C6/36;
- Avaliar a citotoxicidade do EB, FH e FAE da própolis vermelha de Alagoas em células Vero E6 e A549 para determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT) e CC_{50} ;
- Avaliar a atividade antiviral do EB da PVA e suas frações nos ensaios de pré- e pós-tratamento;
- Detectar a percentagem de células infectadas pelo ZIKV por meio de citometria de fluxo intracelular na presença ou ausência dos compostos no ensaio de pós-tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultivo celular e linhagens celulares

Neste projeto, foi realizado o cultivo de três linhagens de células *in vitro* para a realização dos experimentos.

Para a realização dos testes de citotoxicidade, quantificação viral e ensaios antivirais, inicialmente células Vero E6, que são fibroblastos de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram cultivadas em garrafas de cultura com meio DMEM *low* glicose suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA). Além disso, células epiteliais de adenocarcinoma pulmonar humano (A549) (cedidas gentilmente pelo Laboratório de Biologia Celular/UFAL), foram cultivadas sob as mesmas condições que as células Vero E6 com intuito de observar se ocorreria variação de resultados dependentes de linhagem celular. As células foram mantidas em incubadora à 37° C e atmosfera de 5% de CO₂ até a realização dos experimentos.

Outra linhagem celular utilizada durante o estudo foi a C6/36 proveniente do *A. albopictus* sendo cultivadas em meio L-15 suplementado com 10% de SBF, 10% de triptose e 1% de PSA e armazenadas em incubadora à 28° C, para posterior utilização na obtenção dos estoques virais.

4.2 Obtenção do estoque do ZIKV

Após a obtenção de cepa viral do ZIKV, gentilmente cedida pelos professores Dr. Jean Peron e Dr. Edson Durigon do ICB/USP, células C6/36 foram infectadas com o ZIKV e mantidas por 1 h à 28°C. Após este período, o meio de cultura L-15 contendo 2% de soro bovino fetal (SBF) foi adicionado e as células foram incubadas à 28°C por 6 dias, sendo observadas diariamente para identificação de alterações morfológicas indicativas de infecção viral. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado, suplementado com soro bovino fetal (SBF) e armazenado em freezer a -80°C para posterior utilização.

4.3 Extrato bruto (EB) e frações hexânica (FH) e acetato de etila (FAE) da própolis vermelha

As amostras do extrato bruto hidroalcoólico, frações hexânica e acetato de etila da própolis vermelha de Alagoas foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento do Instituto de Ciências Farmacêuticas da UFAL, colaborador deste projeto. A matéria-prima da própolis vermelha foi coletada na cidade de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas, Brasil.

De forma geral, para a obtenção do extrato bruto a própolis vermelha foi moída e colocada em um frasco com etanol a 80%, em um agitador por 48 h. Então, o macerado (a porção líquida) foi misturado com 600 mL de etanol a 80% e colocado no agitador por 24 h. Em seguida, o macerado resultante foi novamente misturado com 600 mL de etanol a 80% e após 24 h foi filtrado em papel filtro e submetido a destilação sob pressão reduzida em evaporador rotativo para remover o solvente. O EB foi fracionado por meio de particionamento líquido-líquido. Para esse efeito, o extrato foi dissolvido em metanol e água na proporção 8: 2 (v / v; volume em 50 mL). Foram adicionados 15 mL de água após agitação vigorosa e deixados em repouso por alguns minutos. A fase metanol/água foi utilizada como base para partição, utilizando-se solventes hexano primeiramente e acetato de etila posteriormente de acordo com o gradiente de polaridade. Neste procedimento, uma agitação suave foi usada para evitar a emergência de emulsões, resultando nas frações hexano e acetato de etila, respectivamente (MENDONÇA et al., 2015).

Após a obtenção dos materiais, as amostras foram pesadas e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para preparação de uma solução inicial nas concentrações de 500 mg/mL para o EB e 50 mg/ml para as frações FH e FA. Em seguida, as amostras foram diluídas em meio DMEM suplementado com 2% de SBF e 1% de PSA para obtenção das concentrações finais de uso nos experimentos.

Tabela 1. Concentração das soluções iniciais e das concentrações iniciais testadas nos ensaios.

Material Teste	Concentração da solução inicial	Concentração inicial utilizada nos ensaios
Extrato bruto	500 mg/ml	400 µg/ml
Fração hexano	50 mg/ml	40 µg/ml
Fração acetato de etila	50 mg/ml	40 µg/ml

4.4 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio colorimétrico de MTT ([Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]). Este ensaio consiste em um método que avalia, de forma indireta, a viabilidade celular por mensurar a atividade mitocondrial das células. Essa análise é realizada tomando por base reações catalisadas por enzimas mitocondriais, onde as desidrogenases reduzem o sal tetrazólio à cristais de formazan. A produção destes cristais é mensurada por espectrofotometria, onde a sua produção é diretamente correlacionada com o número de células viáveis. Desta maneira, altos valores de absorbância indicam uma elevada produção de formazan, o que mostra uma alta atividade enzimática e, conseqüentemente, um maior número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Para a avaliação da citotoxicidade dos materiais teste, células Vero E6 e células A549 foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/mL em 100 µL/poço) e incubadas à 37°C por 16h. Após este período, as monocamadas celulares foram tratadas com diluições duplas seriadas (3,125 a 400 µg/mL - EB e 0,3125 a 40 µg/ml – FH e FAE) das amostras teste (200 µL/poço) em triplicata. Células tratadas apenas com meio de manutenção (DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA) foram consideradas controles celulares. Após a adição dos materiais a serem testados, a placa foi incubada por 72 h em estufa a 37 C° e após este período de incubação, 20 µL de MTT (5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. As placas foram novamente incubadas à 37° C por 3h, sendo posteriormente o sobrenadante aspirado

seguido da adição de 150 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazan produzidos. A placa foi levemente agitada e a densidade óptica foi obtida em espectrofotômetro a 490 nm. O percentual de viabilidade celular foi determinado em relação ao controle celular pela fórmula: $\% \text{ viabilidade} = (\text{absorbância de células tratadas} / \text{absorbância do controle celular}) \times 100$.

4.5 Infecção de células Vero E6 com ZIKV para determinação da viabilidade celular

Para determinar a concentração do ZIKV capaz de reduzir em cerca de 50% a viabilidade da monocamada celular, foi realizada uma diluição seriada de ordem 10 (10^{-1} a 10^{-5}) do vírus e as células foram infectadas com 100 µL/poço. Após 1 h de incubação, a suspensão viral foi substituída por meio DMEM 2% de SBF e a placa foi novamente incubada em estufa por 72h até revelação do experimento por MTT, semelhante ao teste de citotoxicidade.

4.6 Ensaios de avaliação da atividade antiviral

Para avaliação da atividade antiviral dos materiais-teste foram realizadas duas estratégias diferentes: 1) Tratamento da monocamada celular com materiais teste e posterior infecção viral (*Pré-Tratamento*); 2) Tratamento da monocamada celular com os materiais teste após a infecção viral (*Pós-Tratamento*).

4.6.1 Ensaio de Pré-Tratamento

No ensaio de pré-tratamento, as monocamadas celulares foram tratadas com diluições duplas seriadas dos materiais teste (de 3,125 a 100 µg/mL para o EB e de 0,3125 a 10 µg/mL para as frações FH e FAE, 200 µl/poço). Após 2 horas de incubação à 37°C, o sobrenadante foi removido. A adsorção viral foi então realizada pela adição de 100 µL/poço de uma suspensão viral (diluição 10^{-1}) e incubação à 37°C por 1h, homogeneizando a placa em intervalo de 15 min. A suspensão viral foi removida e 200 µL de meio DMEM com 2% de SFB e 1% de PSA foi adicionado às monocamadas celulares, seguido de incubação por 72 h. Após este período, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT para determinação da percentagem de

inibição da replicação viral utilizando-se a fórmula: $\% \text{ Inibição} = (\text{absorbância da amostra com composto} - \text{média absorbância do controle viral}) / (\text{média absorbância do controle celular} - \text{média absorbância do controle viral}) \times 100\%$.

4.6.2. Ensaio de Pós-Tratamento

No ensaio pós-tratamento, as monocamadas celulares foram infectadas com 100 µL/poço da suspensão viral (ZIKV 10⁻¹). Após 1 h de incubação, a suspensão viral foi substituída por diluições duplas seriadas dos materiais testes. A placa foi incubada em atmosfera de CO₂ 5% à 37° C durante 72h para posterior determinação da percentagem de inibição pelo método de MTT conforme descrito previamente.

4.7 Detecção da infecção celular por citometria de fluxo intracelular

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos no pós-tratamento pelo ensaio colorimétrico de MTT, foi realizado um ensaio de marcação intracelular do vírus para análise por citometria de fluxo. Para isto, inicialmente as células Vero E6 foram cultivadas na concentração de 2 x 10⁵/mL em placas de 24 poços por 24 h em meio de cultivo DMEM contendo 10% de soro bovino fetal. A adsorção viral foi então realizada por 1 h com o ZIKV 10⁻¹ à 37° C em estufa de CO₂ realizando-se a homogeneização a cada 15 min. Em seguida, as células infectadas com o vírus foram tratadas com as concentrações máximas não tóxicas dos compostos testes e incubadas por 72 h à 37° C. Após este período, uma suspensão celular foi obtida, seguido da fixação e permeabilização utilizando-se os tampões do BD *Cytofix/Cytoperm Permeabilization Kit* (BD Biosciences) conforme recomendações do fabricante. A marcação intracelular foi realizada utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-flavivírus (clone 4G2) por 1 h a 4° C, cedido gentilmente pelo ICC/FioCruz/PR. Após a lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) por 1 h à 4° C. Ao final do processo, uma lavagem foi realizada e as células suspendidas em PBS contendo 2% de soro bovino fetal para aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto II. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software FlowJo.

4.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6 utilizando o teste one-way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls, sendo o $p \leq 0,05$ considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1- Obtenção do estoque de ZIKV em células C6/36 de *Aedes albopictus*

Neste trabalho, a obtenção do estoque viral para utilização em experimentos posteriores foi realizada em células C6/36 *in vitro*. Durante o período de incubação das células C6/36 infectadas com o ZIKV, foram feitas observações diárias da monocamada no microscópio óptico invertido, sendo identificados os efeitos citopáticos promovidos pelo vírus em comparação ao controle celular (sem vírus). Assim, observou-se alterações morfológicas e destruição da monocamada celular decorrentes da infecção viral, conforme mostrado na figura 6.

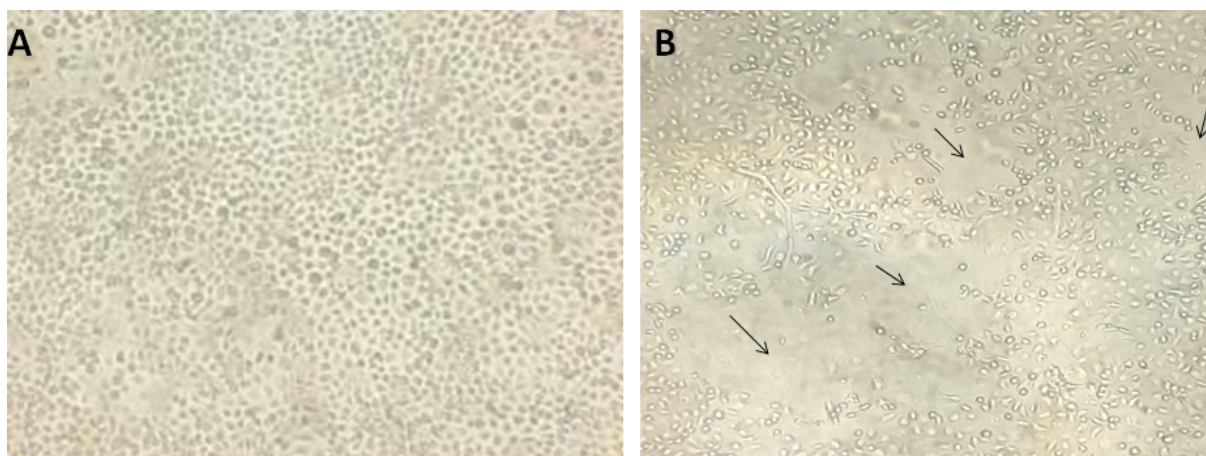


Figura 6. Infecção de células C6/36 pelo ZIKV. Observação ao microscópio invertido no aumento de 40x. A) Células C6/36 não infectadas (controle negativo). B) Células C6/36 seis dias após a infecção pelo ZIKV. Neste caso, é possível observar a destruição da monocamada celular (setas), alteração da morfologia e refringência celular.

5.2 Infecção de células Vero E6 com o ZIKV

Inicialmente, para determinar a taxa de infecção do ZIKV em células Vero E6 uma titulação do vírus foi realizada seguida de análise de viabilidade celular pelo método de MTT. Após 72 h de infecção viral com diferentes diluições do ZIKV, as monocamadas celulares foram observadas por microscopia óptica, sendo identificados efeitos citopáticos nas duas primeiras diluições testadas (10^{-1} e 10^{-2}) quando comparado ao controle negativo (Figura 7).

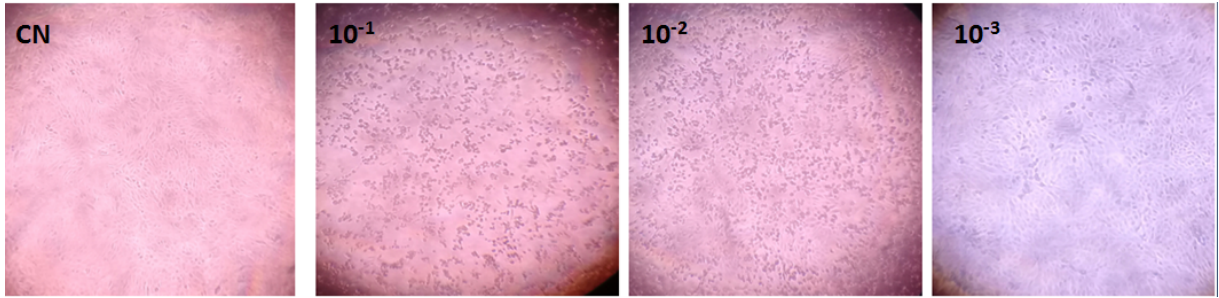


Figura 7. Infecção de células VERO E6 pelo ZIKV *in vitro*. Visualização de efeitos citopáticos em microscopia óptica no aumento de 40x após 72h de infecção. Nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} observou-se destruição da monocamada celular, alteração da refringência celular e formação de aglomerados celulares. No entanto, na diluição 10^{-3} a monocamada celular mostrou-se semelhante ao controle negativo (CN) sem vírus não se detectando alterações significativas.

Ao final deste período, a análise da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT (Figura 8). Após 72 h, nas diluições virais de 10^{-1} e 10^{-2} detectou-se uma redução significativa da viabilidade celular quando comparado ao controle negativo, corroborando com as observações microscópicas previamente identificadas.

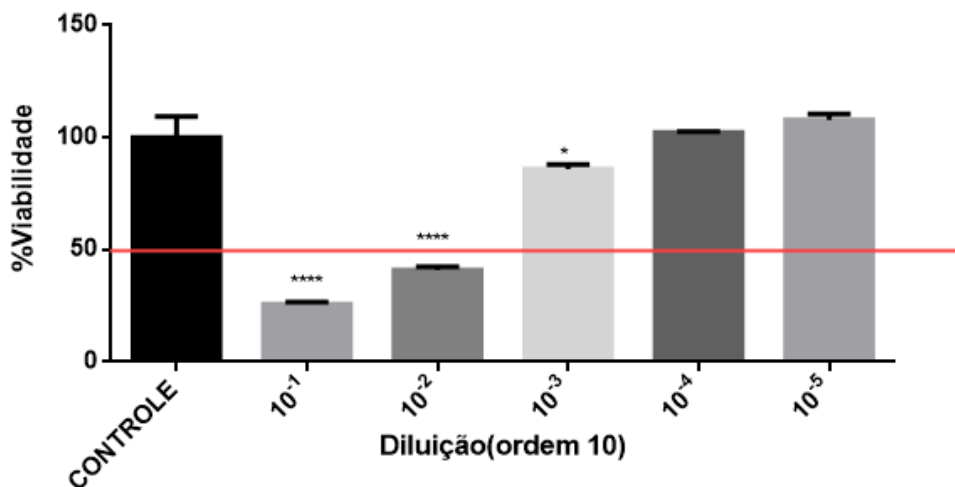


Figura 8. Percentagem de viabilidade celular (%) das monocamadas celulares tratadas com diferentes diluições do ZIKV. Após o período de 72h de infecção viral com diferentes diluições do estoque viral (diluição seriada de ordem 10) a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. No gráfico são mostradas as médias \pm SD. Controle: controle celular negativo. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,001$ comparado ao controle.

5.3 Determinação da citotoxicidade da PVA e suas frações em células Vero E6

Ao avaliar a citotoxicidade de diferentes concentrações do EB e frações (FH e FAE) da PVA em células VERO E6, verificou-se que as duas primeiras diluições do

EB (400 e 200 µg/mL), FH (40 e 20 µg/mL) e a primeira diluição da FAE (40 µg/mL) apresentaram toxicidade evidenciada pela redução da viabilidade celular quando comparado ao controle celular não-tratado (CC) (Figura 9). Além disso, o veículo utilizado para diluição das amostras não se mostrou tóxico na concentração avaliada (Figura 9).

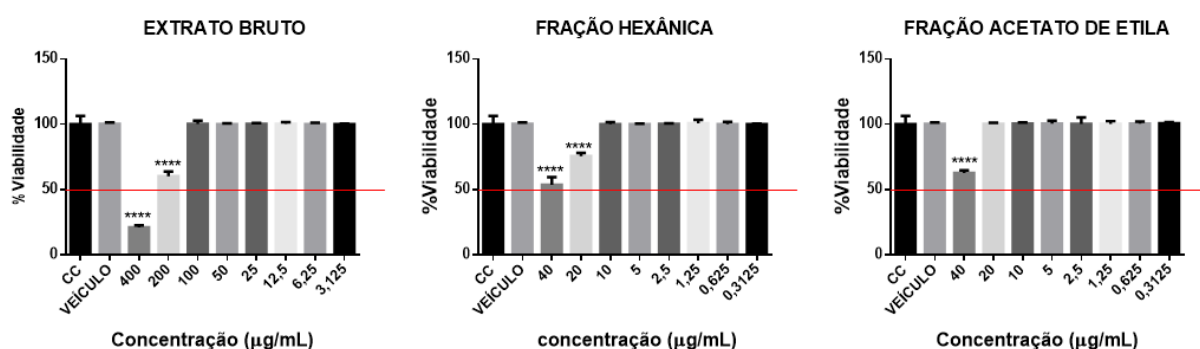


Figura 9. Determinação da citotoxicidade do EB, FH e FAE da própolis vermelha de Alagoas em células Vero E6. A percentagem de viabilidade celular (%) de células VERO E6 tratadas com diferentes concentrações do EB, FH e FAE após 72 h foi determinada pelo ensaio de MTT. CC: controle celular não-tratado. Veículo: células tratadas com DMSO (veículo) na maior concentração testada dos compostos. Média ± SD. **** p ≤ 0,0001 comparado ao CC.

As concentrações citotóxicas para 50% das células (CC_{50}) do EB, FH e FAE foram > 200 µg/ml; > 20 µg/ml e > 40 µg/ml µg/ml, respectivamente (tabela 2). As concentrações máximas não-tóxicas (CMNT) foram definidas como as concentrações iniciais a serem utilizadas nos ensaios antivirais.

Tabela 2. Concentrações máximas não-tóxicas (CMNT) e concentrações tóxicas a 50% das células (CC_{50}) do EB, FH e FAE em células Vero E6 in vitro.

Material Teste	CMNT	CC_{50}
Extrato bruto	100 µg/mL	> 200 µg/mL
Fração hexânica	10 µg/mL	> 40 µg/mL
Fração acetato de etila	20 µg/mL	> 40 µg/mL

5.4 Avaliação da atividade antiviral no ensaio de pré-tratamento

O ensaio de pré-tratamento avalia a capacidade dos materiais teste conferirem resistência às células contra a infecção viral. Geralmente, compostos que apresentam ação nesta fase do ciclo de replicação viral podem estar agindo sobre receptores virais presentes nas membranas celulares ou ativando mecanismo antivirais na célula hospedeira, reduzindo ou impedindo a infecção do vírus na célula. Neste ensaio, o tratamento com os compostos foi realizado 2 h antes da infecção viral.

Como resultado, os compostos testados não apresentaram atividade antiviral em células Vero E6 (Figura 10). Sendo assim, não se detectou uma ação dos mesmos na inibição da infecção do ZIKV nesta estratégia de tratamento.

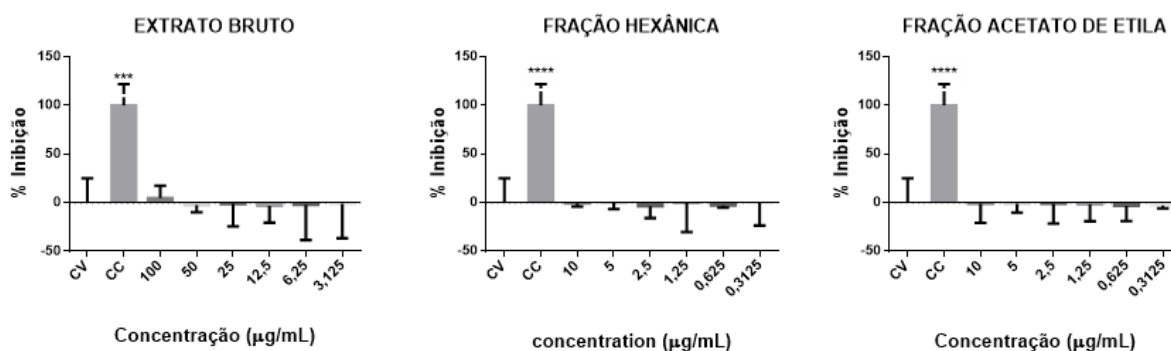


Figura 10. Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pré-tratamento em células Vero E6. Percentagem de inibição viral em células Vero E6 tratadas com diferentes concentrações dos compostos no ensaio de pré-tratamento. CV: controle viral. CC: controle celular negativo. Média \pm SD. *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ comparado ao CV.

5.5 Avaliação da atividade antiviral no ensaio pós-tratamento

O ensaio pós-tratamento investiga se os materiais testes interferem nos processos que vão desde a internalização viral, liberação do RNA no citoplasma, transcrição, tradução, montagem, maturação e liberação de partículas virais. Assim, o tratamento com os compostos foi realizado posteriormente à etapa de infecção viral por 1 h. Como resultado, identificamos que os compostos inibiram significativamente o ZIKV conforme mostrado na Figura 11.

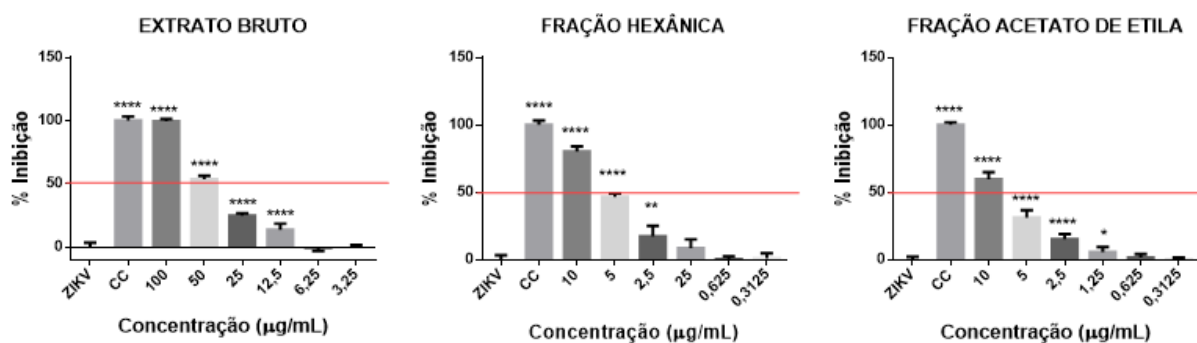


Figura 11. Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pós-tratamento em células Vero E6. Percentagem de inibição viral em células Vero E6 tratadas com diferentes concentrações dos compostos no ensaio de pós-tratamento. ZIKV: controle viral. CC: controle celular negativo. Média \pm SD. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ comparado ao controle viral (ZIKV).

5.6 Determinação da percentagem de células infectadas pelo ZIKV por citometria de fluxo intracelular

Após a avaliação da atividade antiviral do EB e frações da própolis vermelha por meio da técnica colorimétrica de MTT, resultados promissores foram observados nos ensaios de pós-tratamento. Diante disto, foi realizada a marcação intracelular do ZIKV para avaliar se haveria redução da percentagem de células positivas para a infecção viral após o tratamento com os compostos, por meio da análise por citometria de fluxo.

Neste ensaio, uma redução significativa na percentagem de células positivas para o ZIKV foi detectada quando comparado ao controle viral após 72h do tratamento com a CMNT do EB, FH ou FAE (Figuras 12 e 13), confirmando assim os resultados obtidos no ensaio de pós-tratamento pela técnica de MTT.

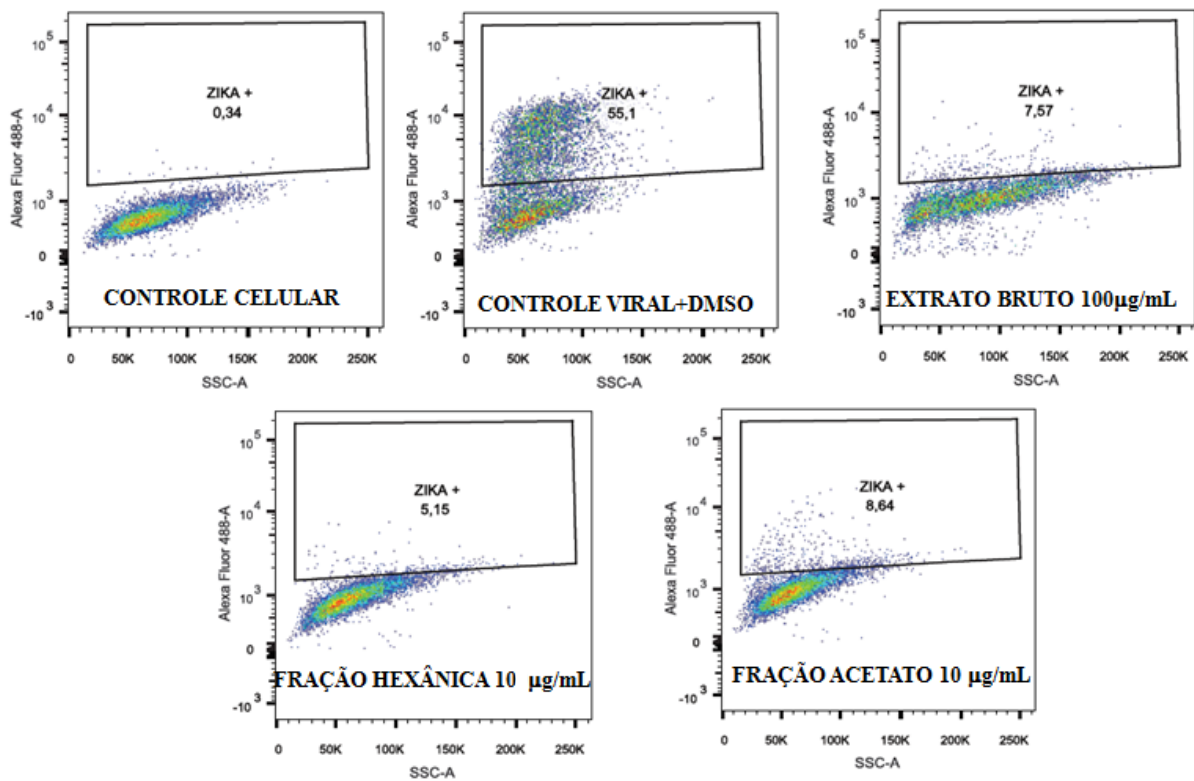


Figura 12. Detecção da percentagem de células positivas infectadas pelo ZIKV por citometria de fluxo intracelular. Dot-Plot (Anti-flavivirus clone 4G2/ anti-IgG camundongo conjugado ao AlexaFluor488 X Side scatter/complexidade ou granulosidade celular) representativo exibindo a percentagem de células positivas para infecção viral.

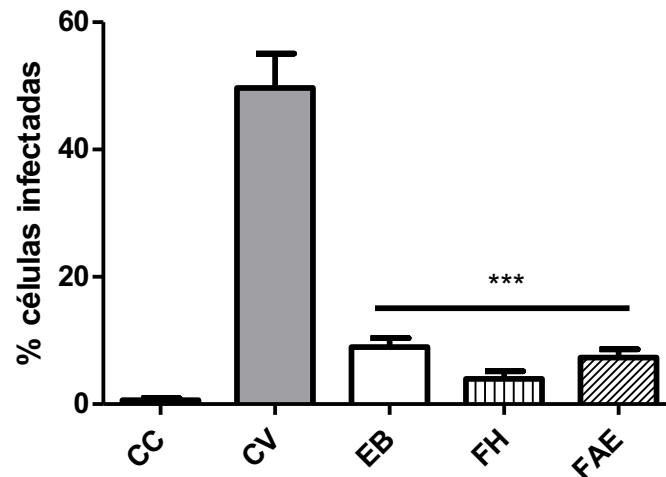


Figura 13. Gráfico exibindo a média ± erro padrão (SEM) da percentagem de células positivas para infecção viral avaliada por marcação intracelular do ZIKV e análise por citometria de fluxo. O resultado demonstra a média da duplicata realizada no experimento. CC = controle celular negativo; CV: controle viral ZIKV; EB, FH e FAE = pós-tratamento com EB (100 µg/mL), FH (10 µg/mL) e FAE (10 µg/mL) da PVA. *** p ≤ 0,001 comparado ao CV.

Após a avaliação da atividade antiviral do EB, FH e FAE contra o ZIKV, utilizando células de mamíferos não humanos, Vero E6, todo o procedimento experimental foi repetido usando células humanas com o intuito de observar se os resultados se repetiriam nesse tipo de célula. Para isso, inicialmente foi realizado o teste de citotoxicidade para identificar quais concentrações dos compostos não seriam tóxicos a este tipo de células e deste modo serem utilizadas nos testes antivirais.

Como resultado, verificou-se que o EB reduziu a viabilidade celular nas três maiores concentrações testadas (400, 200 e 100 µg/ml), enquanto que FH nas concentrações de 40 e 20 µg/ml e FAE na de 40 µg/ml (Figura 14). Assim, as concentrações de 50 µg/ml para o EB e 10 µg/ml para as frações foram selecionadas como concentrações iniciais a serem testadas nos ensaios antivirais.

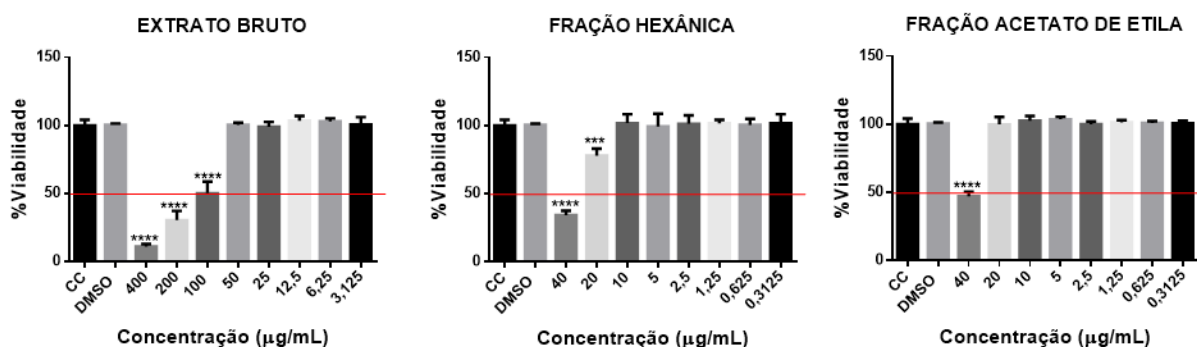


Figura 14. Determinação da citotoxicidade do EB, FH e FAE da própolis vermelha de Alagoas em células A549. A viabilidade celular (%) de células A549 tratadas com diferentes concentrações do EB, FH e FAE após 72 h foi determinada pelo ensaio de MTT. CC= controle celular não-tratado. Veículo: células tratadas com DMSO (veículo) na maior concentração testada dos compostos. Média ± SD. *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ comparado ao CC.

Após determinar as CMNTs, realizamos o ensaio de pré-tratamento das células A549 com diferentes concentrações dos compostos. Deste modo, verificou-se que de forma semelhante aos resultados obtidos com células Vero E6, não houve atividade protetora contra a infecção pelo ZIKV nesta estratégia de tratamento (Figura 15).

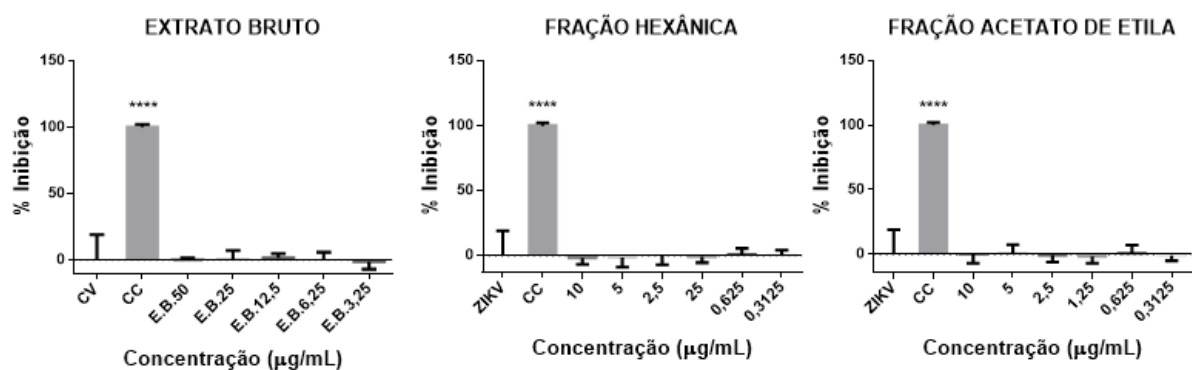


Figura 15. Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pré-tratamento em células A549. Percentagem de inibição viral em células A549 tratadas com diferentes concentrações dos compostos no ensaio de pré-tratamento. CV: controle viral ZIKV. CC: controle celular negativo. Média \pm SD. **** $p \leq 0,0001$ comparado ao CV.

Ao avaliar a ação protetora dos compostos pelo ensaio de pós-tratamento, foi possível identificar uma promissora atividade antiviral, corroborando com os resultados obtidos em células Vero E6. Neste ensaio, as maiores concentrações testadas do EB, FH E FAE apresentaram taxas de inibição viral de 49,66, 70,57 e 59,53%, respectivamente (Figura 16), sugerindo que os compostos testados são capazes de reduzir a infecção celular pelo ZIKV *in vitro*.

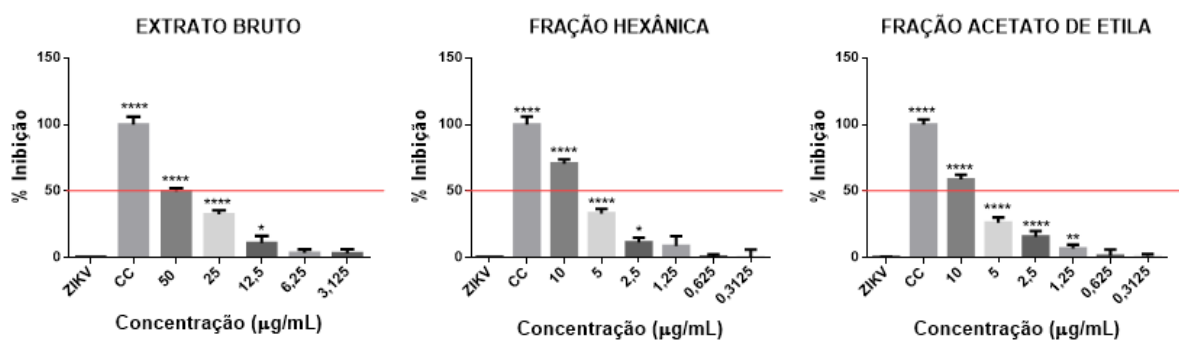


Figura 16. Avaliação da atividade antiviral da PVA e suas frações no ensaio de pós-tratamento em células A549. Percentagem de inibição viral em células A549 tratadas com diferentes concentrações dos compostos no ensaio de pós-tratamento. ZIKV: controle viral. CC: controle celular negativo. Média \pm SD. . * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ comparado ao controle viral ZIKV.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a infecção pelo ZIKV se apresentou como um importante problema de saúde pública, atingindo mais de 60 países e territórios em todo o mundo, tornando esta patologia um fator preocupante para as autoridades de saúde. As principais morbidades associadas à infecção pelo ZIKV estão relacionadas com diversas complicações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré e à malformações congênitas, como a microcefalia, o que contribui com o aumento de taxas de mortalidade no mundo (BMJ, 2016).

Apesar de as várias complicações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV, ainda não existem vacinas ou um tratamento eficaz para o tratamento específico desta arbovirose, sendo o tratamento paliativo a única alternativa terapêutica disponível. Além disso, alguns antivirais de amplo espectro, incluindo interferons (IFNs), ribavirina e favipiravir não podem ser utilizados contra o ZIKV pelas gestantes, principal grupo de risco, uma vez que estes compostos podem desencadear efeitos teratogênicos (BARROWS et al., 2016; VICENTI et al., 2018).

Deste modo, a busca por moléculas com potencial antiviral contra a ZIKV é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de reduzir as morbidades relacionadas com esta infecção, assim como interromper a cadeia de transmissão viral.

Neste contexto, os produtos naturais são alternativas terapêuticas importantes, visto que aproximadamente 60% dos fármacos aprovados e licenciados com efeitos antiviral e antitumoral são de origem natural (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). Dentre os produtos naturais, a própolis vermelha tem sido caracterizada por possuir uma série de propriedades farmacológicas, incluindo atividade antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (ALENCAR et al., 2007; BUENO-SILVA et al., 2013). No entanto, ainda não há estudos na literatura até o presente momento que reportem o efeito antiviral da própolis vermelha contra o ZIKV. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiviral da própolis vermelha de Alagoas contra o ZIKV *in vitro*.

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as células de inseto C6/36 e células de macaco Vero E6. Estas linhagens celulares tem sido amplamente utilizadas na literatura científica, por serem consideradas boas alternativas para a

replicação do ZIKV e para a avaliação da atividade antiviral de compostos bioativos (ADCOCK et al., 2017). No entanto, de acordo com Mumtaz e colaboradores, a atividade antiviral de determinados compostos pode ser modificada dependendo da linhagem celular a ser utilizada (MUMTAZ et al., 2017; SACRAMENTO et al., 2017). Desta forma, com o objetivo de comprovar os efeitos antivirais da própolis, experimentos em células humanas A549 também foram conduzidos, visto que esta linhagem celular é passível de infecção pelo ZIKV (VICENTI et al., 2018).

Inicialmente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pela técnica de MTT. Esta etapa é necessária, pois avalia a atividade citotóxica dos compostos e possibilita a identificação das CMNTs dos materiais teste, sendo estas as concentrações iniciais escolhidas para a realização dos testes antivirais (PUTMAN et al., 2002).

Os resultados obtidos no ensaio de MTT evidenciaram que o tratamento com o extrato bruto (EB) da própolis vermelha nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL não apresentaram efeitos citotóxicos tanto nas células Vero E6 como nas células A549. No entanto, o tratamento com o EB na concentração de 100 µg/mL foi capaz de reduzir em aproximadamente 50% a viabilidade das células A549, enquanto que nas células Vero E6 esta concentração não alterou a viabilidade celular quando comparado ao controle negativo. Esse resultado pode ser explicado possivelmente pelo fato da célula A549 ser uma linhagem de adenocarcinoma de pulmão, e pelo potencial antitumoral da própolis vermelha previamente reportado (MENDONÇA et al., 2015). Adicionalmente, pôde-se observar que o tratamento com EB nas concentrações de 200 e 400 µg/mL apresentou um efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares.

Simoni e colaboradores (2018) avaliaram a citotoxicidade da PVA em células Vero E6 e verificaram que o tratamento com este tipo de própolis a 125 µg/mL não apresentou efeito citotóxico, sendo assim, um valor próximo ao encontrado no presente estudo (100 µg/mL) (SIMONI et al., 2018).

Uma vez definida as concentrações que seriam utilizadas nos ensaios antivirais, outro conjunto experimental foi conduzido com o objetivo de avaliar a atividade antiviral do EB, FH e FAE. Para isso, duas estratégias metodológicas diferentes foram utilizadas. Inicialmente, o ensaio de pré-tratamento foi conduzido com o intuito de avaliar se os compostos confeririam proteção das células Vero E6 e A549

contra a infecção viral. Por outro lado, o ensaio de pós-tratamento foi realizado para avaliar se os compostos têm ação sobre as etapas do ciclo de replicação viral.

No ensaio de pré-tratamento, como mostrado nas figuras 10 e 15, foi observado que as diferentes amostras, em todas as concentrações testadas não foram capazes de inibir de forma significativa a infecção do ZIKV nestas linhagens celulares no tempo de pré-incubação avaliado no presente estudo.

No ensaio de pós-tratamento, verificou-se uma inibição viral significativa decorrente do tratamento com o EB, FH e FAE da própolis vermelha, tanto nas células Vero E6 como nas células A549. Em conjunto, estes resultados evidenciaram uma atividade antiviral promissora, visto que estes compostos apresentaram uma atividade biológica tanto no modelo *in vitro* de infecção de células de mamíferos não humanos (Vero E6) como na linhagem celular de origem humana (A549) pelo ZIKV.

Em outro estudo, foi reportado o efeito antiviral da própolis vermelha contra o herpesvírus suíno, equino, bovino, com valores de inibição de 97,8%, 87,7% e 95,8%, respectivamente (SIMONI et al., 2018).

A atividade antiviral de diversos constituintes da própolis vermelha foi descrita previamente na literatura, destacando-se o efeito da daidzeína contra o vírus Influenza, Hepatite B e 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). Ainda, em outro estudo, foi mostrado que o tratamento com o flavonoide naringenina foi capaz de reduzir a infecção por ZIKV em células A549 humanas de maneira dependente da concentração e independente da linhagem de ZIKV (HENRIQUE et al., 2019).

Para confirmar o efeito antiviral da própolis vermelha, a detecção da percentagem de células infectadas foi determinada por marcação intracelular do ZIKV em células Vero E6 utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-flavivirus (clone 4G2) seguido de análise por citometria de fluxo. Esta metodologia é capaz de analisar simultaneamente diversos parâmetros de células ou partículas em suspensão e vem sendo utilizada para detecção da infecção e titulação de diversos vírus de interesse em saúde humana (DRAYMAN; OPPENHEIM, 2011). Como mostrado nas figuras 12 e 13, o tratamento com a CMNT do EB, FH e FAE foi capaz de reduzir de forma significativa a percentagem de células infectadas positivas para o ZIKV comparado ao

controle viral, confirmando assim os resultados obtidos previamente pela técnica de MTT.

Os nossos resultados reforçam a importância dos produtos de origem natural como promissoras fontes de pesquisa e descoberta de compostos biologicamente ativos contra infecções virais, tendo em vista que os materiais testados foram capazes de reduzir a infecção pelo ZIKV em diferentes linhagens celulares.

Vale ressaltar que a indicação destes compostos como medicamento contra o ZIKV em seres humanos ainda não é possível apenas com os resultados aqui demonstrados. No entanto, a eficaz atividade antiviral do EB, FH e FAE nos ensaios *in vitro* sugere que a própolis vermelha apresenta componentes em sua constituição com atividade antiviral contra o ZIKV. Para isto, novos ensaios *in vitro* e *in vivo* assim como ensaios clínicos devem ser realizados para confirmar este potencial antiviral principalmente pelo fato de que não existem medicamentos antivirais específicos atualmente disponíveis contra esse vírus para o tratamento desta arbovirose.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível identificar uma maior toxicidade do extrato bruto da própolis vermelha à linhagem celular humana de carcinoma pulmonar, A549, em relação às células de mamífero não-humanos, Vero E6.

Nos ensaios de pré-tratamento os materiais teste não foram capazes de conferir ação protetora contra a infecção pelo ZIKV a nenhuma das duas linhagens celulares utilizadas nos experimentos no período de tempo avaliado.

Por outro lado, na estratégia de pós-tratamento tanto o EB quanto FH e FAE apresentaram promissora atividade antiviral contra o ZIKV *in vitro*, conferindo altos percentuais de inibição viral nas maiores concentrações testadas tanto em células vero E6 quanto em células A549 quando avaliadas pelo teste de MTT. Posteriormente estes resultados foram confirmados por citometria de fluxo intracelular na linhagem de células Vero 6.

Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que o extrato bruto e as diferentes frações de própolis vermelha de Alagoas apresentaram uma promissora atividade antiviral contra o ZIKV *in vitro*, uma vez que o pós-tratamento com estes compostos foi capaz de reduzir a infecção pelo ZIKV tanto em células de macaco, VERO E6, como em células humanas A549.

Vale ressaltar que estudos futuros devem ser conduzidos para elucidar os mecanismos de ação responsáveis por esta atividade antiviral, assim como para o isolamento e caracterização de moléculas biologicamente ativas presentes na própolis vermelha, contribuindo assim para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento desta arbovirose.

REFERÊNCIAS

1. ABBINK, Peter; STEPHENSON, Kathryn E.; BAROUCH, Dan H. Zika virus vaccines. **Nature Reviews Microbiology** v. 16, n. 10, p. 594–600 , 2018.
2. ADCOCK, Robert S et al. Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. **Antiviral Research** , 2017.
3. ALENCAR, S M et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology** v. 113, p. 278–283 , 2007.
4. ALMEIDA, Irlan et al. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 110, p. 267–279 , 2016.
5. ASHWAL, S. et Al. Practice Parameter : Diagnostic assessment of the child with Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. , 2009.
6. ATIF, Muhammad et al. Zika virus disease: a current review of the literature. **Infection** v. 44, n. 6, p. 695–705 , 2016.
7. BANKOVA, Vassya. Recent trends and important developments in propolis research. v. 2, n. 1, p. 29–32 , 2005.
8. BARROWS, Nicholas J et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection Resource A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe** p. 259–270 , 2016.
9. BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance** v. 19, n. 13, p. 8–11 , 2014.
10. BEZERRA GALINDO. Alexandre. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Caracterização do extrato de própolis vermelha, avaliação de suas propriedades biológicas e desenvolvimento de gel à base do extrato.** [S.l: s.n.], 2007.

11. BMJ. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. , 2016.
12. BOYER, Sébastien et al. An overview of mosquito vectors of Zika virus. **Microbes and Infection** v. 20, n. 11–12, p. 646–660 , 2018.
13. BROGUEIRA, Pedro; MIRANDA, Ana Cláudia. Vírus Zika : Emergência de um Velho Conhecido Zika Virus : Emergence of an Old Known Resumo Abstract. p. 146–153 , 2015.
14. BUENO-SILVA, Bruno et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **J. Agric. Food Chem** , 2013.
15. CAO-LORMEAU, V M; BLAKE, A; et al. Europe PMC Funders Group Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. v. 387, n. 10027, p. 1531–1539 , 2016.
16. CAO-LORMEAU, V M; #2, Blake; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia Europe PMC Funders Group. **Lancet** v. 387, p. 1531–1539 , 2016.
17. CHUNG, Shu Ting et al. Novel daidzein analogs and their in vitro anti-influenza activities. **Chemistry and Biodiversity** v. 12, n. 4, p. 685–696 , 2015.
18. CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J.; SNADER, Kenneth M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products** v. 60, n. 1, p. 52–60 , 1997.
19. CUETO, Ana Paula et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 evírus da diarreia viral bovina. **Ciencia Rural** v. 41, n. 10, p. 1800–1806 , 2011.
20. DAI, Wenwen et al. Antiviral efficacy of flavonoids against enterovirus 71 infection in vitro and in newborn mice. **Viruses** v. 11, n. 7 , 2019.
21. DE ARAÚJO, Thalia Velho Barreto et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases** v. 16, n. 12, p. 1356–1363 , 1 dez. 2016.
22. DE MENDONÇA, Izabel Cristina Gomes et al. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 15, n. 1, p. 357 , 14 dez. 2015.

23. DICK, G.W.A; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 46, n. 5, p. 509–520 , 1 set. 1952.
24. DRAYMAN, Nir; OPPENHEIM, Ariella. Rapid titration of viruses by flow cytometry. **Current Protocols in Cell Biology** n. SUPP.51, p. 1–7 , 2011.
25. DUFFY, Mark R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine** v. 360, n. 24, p. 2536–2543 , 11 jun. 2009.
26. FAYE, Oumar et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20 th Century. v. 8, n. 1, p. 1–10 , 2014.
27. FROZZA, DA SILVA, CO, GARCIA, CSC, GAMBATO, G., DE SOUZA, MDO, SALVADOR, M., MOURA, S., ... ROESCH-ELY, M. Chemical characterization , antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology** v. 52, p. 137–142 , 2013.
28. GÖERTZ, Giel P. et al. Functional RNA during Zika virus infection. **Virus Research** REFERÊNCIA PARA A CLASSIFICASSÃO DO VÍRUS ZIKA, v. 254, n. August 2017, p. 41–53 , 2018.
29. GUERBOIS, Mathilde et al. Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. **Journal of Infectious Diseases** v. 214, n. 9, p. 1349–1356 , 2016.
30. HAYES, Edward B. Zika Virus Outside Africa. v. 15, n. 9, p. 2007–2010 , 2009.
31. HENNESSEY, Morgan; FISCHER, Marc; STAPLES, J Erin. Vírus zika se espalha para novas áreas — Região das Américas , maio de 2015 — janeiro de 2016. v. 65, n. 3 , 2016.
32. HENRIQUE, Allan et al. The citrus flavonoid naringenin impairs the in vitro infection of human cells by Zika virus. **Scientific Reports** v. 9, p. 1–15 , 2019.
33. KITASATO, Kaio; wang yifei; kobayashi nobuyuki. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. v. 1, n. 1, p. 1–9 , 2007.
34. KOOL, Jacob L et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. p. 2536–2543 , 2009.
35. KUIVANEN, Suvi et al. Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection in vitro and differentially affect cellular signaling,

- transcription and metabolism. **Antiviral Research** v. 139, n. 2017, p. 117–128 , 2017.
36. KUNO, Goro et al. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology** v. 72, n. 1, p. 73–83 , 1998.
37. LUTOSA, SARA R.; GALINDO, ALXANDRE B. ; NUNES, LIVI C.C.; RANDAU, KARINA P. ; NETO, Pedro J. RO. Divulgação Própolis : atualizações sobre a química e a farmacologia. v. 18, n. 3, p. 447–454 , 2008.
38. MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 48, n. 2, p. 139–145 , 1954.
39. MICHAELIS, Martin; SITHISARN, Patchima; CINATL, Jindrich. 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.
40. MOSMANN, Tim. 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.
41. MUMTAZ, Noreen et al. Cell-line dependent antiviral activity of sofosbuvir against Zika virus. **Antiviral Research** v. 146, p. 161–163 , 2017.
42. MUSSO, D; NILLES, E J. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection** v. 20, n. 10, p. O595–O596 , 2014.
43. MUSSO DIDIER, ROCHE CLAUDINE, ROBIN EMILIE, NHAN TUXUAN, TESSIER ANITA, Cao-Lormeau van-Mai. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases** v. 21, n. 4, p. 359–3 , 2015.
44. MUSSO, Didier et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology** v. 68, p. 53–55 , 2015.
45. MUSSO, Didier; BELTRAME, Anna; ZAMMARCHI, Lorenzo. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil Schistosomiasis Screening of Travelers from Italy with Possible Exposure in Corsica , France. v. 21, n. 10, p. 2015 , 2016.
46. MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika Virus. , 2016.
47. NUNES, Magda Lahorgue et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**

- v. 92, n. 3, p. 230–240 , 2016.
48. PARK, YONG K.; ALENCAR, SEVERINO M.; AGUIAR, CLAUDIO L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **J. Agric. Food Chem.** p. 2502–2506 , 2002.
49. PEREIRA, Santos; SEIXAS, Rodrigo; NETO, Francisco. PROPOLIS: 100 YEARS OF RESEARCH AND FUTURE PERSPECTIVES. **Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro** v. 25, n. 2, p. 321–326 , 2002.
50. PEREIRA, Sofia. Moléculas Antivirais – Que futuro? , 2012.
51. PERERA, Rushika; KHALIQ, Mansoor; KUHN, Richard J. Closing the door on flaviviruses : Entry as a target for antiviral drug design. v. 80, p. 11–22 , 2008.
52. PICCINELLI, Anna Lisa et al. Cuban and Brazilian Red Propolis : Botanical Origin and Comparative Analysis by High-Performance Liquid Chromatography À Photodiode Array Detection / Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** p. 6484–6491 , 2011.
53. ROMERO, Marta 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.
54. SACRAMENTO, Carolina Q et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Nature Publishing Group** n. December 2016, p. 1–12 , 2017.
55. SAIZ, Juan-Carlos; MARTÍN-ACEBES, Miguel A. The Race To Find Antivirals for Zika Virus. , 2017.
56. SILICI, Sibel; KUTLUCA, Semiramis. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **journal of Ethnopharmacology** 99 v. 99, p. 69–73 , 2005.
57. SIMONI, Isabela Cristina et al. In vitro antiviral activity of propolis and Baccharis sp . extracts on animal herpesviruses. **ANIMAL PATHOLOGY** p. 1–7 , 2018.
58. SITHISARN, Patchima 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.
59. TRUSHEVA, Boryana et al. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis.

- Evidence-Based Complementary Alternative Medicine** v. 3, p. 249–254 , 2006.
60. VARGAS, Alexander et al. Características dos primeiros casos de microcefalia possivelmente relacionados ao vírus Zika notificados na Região Metropolitana de Recife, Pernambuco. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil** v. 25, n. 4, p. 691–700 , 2016.
61. VASCONCELOS, Walison A et al. Bioactive Glass-Green and Red Propolis Association: Antimicrobial Activity Against Oral Pathogen Bacteria. **Natural products chemistry and research** v. 2, n. 6 , 2014.
62. VICENTI, Ilaria et al. Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds in vitro. **Virus Research** v. 244, n. November 2017, p. 64–70 , 2018.
63. VIEGAS, Cláudio; DA SILVA BOLZANI, Vanderlan; BARREIRO, Eliezer J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova** v. 29, n. 2, p. 326–337 , 2006.
64. YILDIRIM, Ayse et al. Antiviral Activity of Hatay Propolis Against Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. **Med Sci Monit** p. 422–430 , 2016.
65. ZANDI, Keivan et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal** v. 8, p. 1–11 , 2011.
66. ZANLUCA, Camila et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. v. 110, n. June, p. 569–572 , 2015.
67. ZHANG RONG, Miner j.Jhonathan. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses. **Physiology & behavior** v. 176, n. 3, p. 139–148 , 2017.